



Disseny racional de lligands del receptor opioide i d'anàlegs d'opiorfina

Mònica Rosa Expósito



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement 3.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento 3.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution 3.0. Spain License.**

Programa de Doctorat de Química Orgànica

Departament de Química Orgànica

Universitat de Barcelona

DISSENY RACIONAL DE L·LIGANDS DEL RECEPTOR OPIOIDE I D'ANÀLEGS D'OPIORFINA

Memòria presentada per Mònica Rosa Expósito per optar al títol de
doctora per la Universitat de Barcelona

Doctoranda

Mònica Rosa Expósito

Directors

Dr. Gregori Valencia

Dra. Gemma Arsequell

Institut de Química Avançada de Catalunya

Consejo Superior de Investigaciones Científicas

Tutor

Dr. Ernesto Nicolás

Departament de Química Orgànica

Universitat de Barcelona



**Llegar a la meta no es vencer,
lo importante es el camino y en él,
caer, levantarse, insistir y aprender.**

Mago de Oz

Agraïments

Quan s'acosta la fi d'una fase, és impressionant mirar enrere i veure realment tot el que ha passat. Adonar-se'n de tota la feina que s'ha fet, de tanta gent que ha passat al teu voltant i t'ha donat un cop de mà o de tants moments compartits fossin alegres o durs.

No podria començar millor aquesta memòria de tesi sinó agraint a tothom que hi ha al meu voltant per com m'han ajudat, de vegades sense saber-ho, amb la seva energia, la seva força, el seu recolzament i la seva creativitat.

Per començar, vull donar les gracies al Gregori i la Gemma per la gran oportunitat que em van donar en escollir-me en aquella entrevista de feina, ara ja fa 5 anys. Per permetre'm i, sobretot, animar-me a que el que inicialment anava a ser una simple feina, pogués esdevenir una tesi. Per tots els coffe-coachings, pels seus consells i pel seu interès més enllà del camp professional.

També vull agrair als nostres col·laboradors dins el projecte per la seva aportació, sense ells aquest no hauria pogut ser mai un projecte multidisciplinari com cal. A la Prof. Nuria B. Centeno i la Dra. Marta Pinto en el camp computacional, a la Prof. Raquel E. Rodríguez i la Dra. Verónica González-Núñez en el camp d'assajos d'afinitat, al Prof. Jesús Jiménez-Barbero i la Filipa Marcelo en el camp de la RMN i al Prof. Leonardo Pardo i el Dr. Gianluigi Caltabiano en els estudis sobre l'estructura cristal·logràfica del receptor. Treballar amb tots vosaltres ha estat realment productiu i gratificant.

Fer una especial menció a la Dra. Catherine Rougeot i l'Evelyne Dufour, així com també al Dr. Talmont per la seva agradable acollida en els seus laboratoris, per tot el que em van ensenyar i per seguir col·laborant amb nosaltres després de les corresponents estades.

A tots aquells que davant la cerca de la seva experiència i coneixements, ens han obert tan amable i desinteressadament les seves portes. Al Prof. Jaume Granell, al Dr. Francesc Canals, al Dr. Joan Josep Bech, a la Dra. Carme Quero, a la Dra. Meritxell Egido, a la Francesca Cingolani, a la Cindy Nájera i a la Prof. Anna Grandas. Moltíssimes gracies per la vostra ajuda.

A tots els companys de laboratori, al Siscu, a la Rebeca, a la Jenifer, al Lluís i a l'Emili. Hagueu estat molt o poc temps, sempre us recordaré amb molt carinyo.

Al personal dels serveis i d'administració del CSIC, per la seva feina ben feta, sigui mantenint els equips en condicions impecables, ensenyant-me com fer que els aparells es rendeixin quan no volen creure, pujant les comandes 3 segons després d'haver-les encarregar o donant-me un cop de mà amb la burocràcia pertinent. Gracies per fer-nos la vida una mica més fàcil.

Als companys del TTR team, per deixar-me assistir a reunions i dinars tant interessants en aquests anys. La bona sintonia entre tots vosaltres, tota la creativitat que despreneu i l'esforç que hi poseu sigueu del PCB, de l'IQS, de la UPF o del CSIC, ha estat un raig d'inspiració per mi.

Als amics de la facultat, amb especial atenció a aquells que van estar al meu costat en temps de vaques primes. Montse i Marc, mai no us ho podré agrair prou.

Al Dani, la Marta, el Lluís, l'Ignasi, al Marc i als amics del Chemecol, per la vostra amistat, els infinits dinars, les estones tan fantàstiques passades i el vostre suport amb els meus hobbies. Estic encantada de tenir uns clients tant assidus a la meva pastisseria.

Per acabar, a tota la meva família per la seva profunda confiança en mi i el seu suport al llarg de la meva vida, però sobretot, al Jordi, per voler compartir-la amb mi i ajudar-me tantíssim. Molt i sempre, rei.

Índex

Introducció

I.1. El dolor	17
I.2. Mecanismes del dolor	19
I.3. Fàrmacs analgèsics	21

Objectius	25
------------------------	-----------

Capítol 1. Estudis estructurals del receptor opioide

1.1. Introducció	27
1.2. Objectius.....	30
1.3. Tècniques emprades	31
1.3.1. Tècniques proteòmiques.....	31
1.3.2. Modificacions químiques de biomolècules	36
1.3.3. El reactiu de iodació IPy ₂ BF ₄	38
1.4. Resultats i discussió	40
1.4.1. Posada a punt de tècniques proteòmiques amb proteïnes model.....	40
1.4.2. Iodació de proteïnes model.....	45
1.4.3. Obtenció, estudis proteòmics i intents de iodació del receptor opioide	53
1.5. Conclusions	70

Capítol 2. Estudis SAR de lligands del receptor opioide

2.1. Introducció	71
2.1.1. Lligands endògens del receptor opioide	71
2.1.2. Anàlegs glicosilats d'encefalines.....	73

2.1.3. Enllaç d'halogen	74
2.2. Objectius.....	77
2.3. Tècniques emprades	78
2.3.1. Síntesi de pèptids	78
2.3.2. Síntesi d'aminoàcids glicosilats (<i>building blocks</i>)	79
2.4. Resultats i discussió	81
2.4.1. Anàlegs glicosilats de [D-Met ² ,Pro ⁵]encefalinamida	81
2.4.2. Enllaç d'halogen	88
2.5. Conclusions	99

Capítol 3. Opiorfina

3.1. Introducció	101
3.1.2. Metabolisme de les Encefalines.....	101
3.1.3. Inhibidors d'encefalinases.....	102
3.1.4. Opiorfina, un inhibidor dual endogen	105
3.2. Objectius.....	107
3.3. Tècniques emprades	108
3.3.1. Assaig FRET	108
3.4. Resultats i discussió	112
3.4.1. Síntesi d'anàlegs	112
3.4.2. Test d'activitat.....	113
3.4.3. Estudi SAR de l'opioirfina	116
3.4.4. Proposta de la conformació bioactiva de la opioirfina.....	130
3.5. Conclusions	136

Materials i mètodes

M.1. Reactius.....	137
M.2. Instrumentació	139
M.3. Metodologia	141
M.3.1. Receptor Opiode.....	141
M.3.1.1. Assajos de proteòmica	141
M.3.1.2. Posada a punt de la metodologia de iodació de proteïnes	145
M.3.1.3. Obtenció del receptor opioide.....	147
M.3.1.4. Proteòmica sobre el receptor opioide.....	151
M.3.1.5. Assajos de iodació sobre cèl·lules	153
M.3.2. Lligands del receptor opioide	154
M.3.2.1. Mètodes generals.....	154
M.3.2.2. Síntesi de glicosilaminoàcids protegits	157
M.3.2.3. Síntesi de O-Glicopèptids i del pèptid patró.....	164
M.3.2.4. Síntesi de pèptids opioides halogenats i patrons	169
M.3.3. Opiorfina.....	180
M.3.3.1. Síntesi d'anàlegs d'opiorfina.....	180
M.3.3.2. Assajos d'inhibició <i>in vitro</i> per AP-N i NEP	199

Conclusions generals.....	203
Bibliografia	205
Annex	221
Articles	223
Pòsters	239

Abreviatures i acrònims

Abz	<i>Orto</i> -aminobenzoïl	Brij35	Tricosaoxahen
Ac	Acetil		octacontanol
ACE	Enzim convertidor d'angiotensina	Bz	Benzoïl
ACN	Acetonitril	C ₄	Fase estacionària de cadena butílica
AcOH	Àcid acètic	C ₁₈	Fase estacionària de cadena octadecílica
αCN	Àcid α-ciano-4- hidroxicinnàmic	calc.	Calculat
ADME	Perfil farmacològic d'administració, distribució, metabolisme i excreció	CAM	Carboxamidometil
		CCF	Cromatografia en capa fina
α-GalNAc	α- <i>N</i> -Acetil-D- galactosamina	Cel	Celobiosa
AINEs	Antiinflamatoris no esteroïdals	CHO	Cèl·lules ovàriques de <i>Cricetulus griseus</i> (hàmsster xinès)
Ala (A)	Alanina	Cit	Citru·lina
AMC	7-Amino-4- metilcumarina	Myc-tag	Etiqueta de seqüència EQKLISEEDL
AP-N	Aminopeptidasa N	¹³ C-NMR	Ressonància magnètica nuclear de carboni
Arg (R)	Arginina		
Asn (N)	Asparagina	CSIs	Índexs de desplaçaments químics
Asp (D)	Àcid aspàrtic	Cys (C)	Cisteïna
APS	Persulfat d'amoni	d	Doblet
BSA	Seroalbúmina bovina	DHB	Àcid 2,5- dihidroxibenzoïc
BCA	Assaig quantitatiu d'àcid bicinconínic	DIC	<i>N,N'</i> -Diisopropil carbodiimida
β-GlcNAc	β- <i>N</i> -Acetil-D- galactosamina	DIEA	Diisopropiletilamina
BHE	Barrera hematoencefàlica	D-Met	D-Metionina
Bpa	<i>Para</i> -benzoïl- fenilalanina	DMSO	Dimetilsulfòxid
		δ ₁ OR	Receptor opioide δ ₁
		δ ₂ OR	Receptor opioide δ ₂

D-Phe	D-Fenilalanina	¹ H-ROESY	Espectroscòpia d'efecte
D-Ser	D-Serina		Nuclear Overhauser de
DTT	Ditiotreitol		marc rotatori de protó
<i>E. coli.</i>	<i>Escherichia coli</i>	His (H)	Histidina
EDDnp	1-[2,4-Dinitrofenil] etilendiamina	His-tag	Etiqueta de seqüència HHHHHH
EDTA	Àcid etilendiamina tetraacètic	hμOR	Receptors opioïdes μ humans
EM	Espectrometria de masses	¹ H-NMR	Ressonància magnètica nuclear de protó
ESI	Ionització per electrospray	H ₂ O MilliQ	Aigua purificada i desionitzada en alt grau
EtOH	Etanol		amb el sistema
eq	Equivalents		Millipore
Fmoc	Fluorenilmetoxi carbonil	HOBt	Hidroxibenzotriazol
FRET	Transferència d'energia de fluorescència per ressonància	Hhe	Homofenilalanina
		HPLC	Cromatografia líquida d'alta resolució
Gal	Galactosa	HQ	8-Hidroxiquinolina
Glc	Glucosa	HRMS	Espectre de masses d'alta resolució
Glu (E)	Àcid glutàmic		
Gln (Q)	Glutamina	HRP	Peroxidasa de rave picant
Gly (G)	Glicina		
GPCR	Receptors de membrana acoblats a proteïna G	IAA	Iodoacetamida
		IC ₅₀	Meitat de la concentració inhibidora màxima
h	Hores		
¹ H- ¹³ C-HSQC	Espectroscòpia de correlació de simple quantum protó-carboni	Ile (I)	Isoleucina
		IPy ₂ BF ₄	τetrafluoroborat de bis(piridina) iodonil(I)
¹ H-COSY	Espectroscòpia de correlació homonuclear de protó	Ki	Constant d'afinitat d'un l·ligand pel receptor
		Lac	Lactosa
¹ H-TOCSY	Espectroscòpia de correlació total de protó	Leu (L)	Leucina
		Lys (K)	Lisina

M	Massa	p/v	Tant per cent
m	Multiplet		massa/volum
MALDI	Desorció / ionització làser assistida per matriu	PVDF PyBOP	Difluorur de polivinilidè Hexafluorofosfat de benzotriazoliloxi- tris[pirrolidino]fosfoni
Man	Mannosa		
MeOD-d ₄	Metanol deuterat	QM/MM	Càlculs de mecànica quàntica i mecànica molecular
MeOH	Metanol		
MeONa	Metòxid sòdic		
Met (M)	Metionina	RFU	Unitats de fluorescència relatives
min.	Minuts		
μOR	Receptor opioide μ	RO	Receptors opioïdes
MPLC	Cromatografia líquida de resolució mitjana	RP s	Fase reversa Singlet
m/z	relació entre massa i càrrega	SA SAR	Àcid sinapínic Relació estructura- activitat
NEP	Neprilisina o Endopeptisada neutra	SHSY-5Y	Cèl·lules de neuroblastoma humà
NOE	Efecte nuclear Overhauser	SDS	Dodecilsulfat sòdic
Nphe	N-benzil-glicina	SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida amb dodecilsulfat sòdic
ORL1	Receptor de nociceptina		
OMS	Organització Mundial de la Salut	Ser (S) SPE	Serina Extracció en fase sòlida
PBS	Tampó de fosfat salí	t	Triplet
PBST	Tampó de fosfat salí amb Tween	T7-tag	Etiqueta de seqüència MASMTGGGQ MG
PDB	<i>Protein Data Bank</i>	t.a.	Temperatura ambient
Pfp	Pentafluorofenol	^t Bu	<i>Tert</i> -butil
Phe (F)	Fenilalanina	^t BuOMe	<i>Tert</i> -butil metil éter
Phg	Fenilglicina	TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -tetrametil etilendiamina
Pmc	2,2,5,7,8-Pentametil- croman-6-sulfonil	Temp.	Temperatura
Pro (P)	Prolina	TFA Thr (T)	Àcid trifluoroacètic Treonina

TIS	Tris-isopropil-silà	Tyr (Y)	Tirosina
TOF	Temps de vol	UPLC	Cromatografia líquida d'ultra resolució
t. r.	Temps de retenció	UV	Radiació ultraviolada
Tris	Tris(hidroximetil) aminometà	Val (V)	Valina
Trp (W)	Triptòfan	v/v	Tant per cent
Trt	Tritil		volum/volum

Introducció

L'edició de 2006 del programa La Marató de TV3 es va dedicar al dolor crònic, un símptoma que resulta ser la primera causa de visita als centres d'atenció primària a Catalunya. Sovint vinculat a patologies com l'artrosi, la fibromiàlgia o el càncer, la incidència creixent del dolor crònic en societats desenvolupades i el seu impacte físic i emocional estan aconseguint que la societat s'adoni de la importància d'aquesta patologia. Els prop de 7 milions d'euros recaptats es van emprar per avançar en el coneixement dels mecanismes bàsics del dolor crònic i la raó de l'aparició en diverses malalties, en les tècniques de diagnòstic i en trobar nous medicaments i noves estratègies terapèutiques per eliminar-lo o pal·liar-lo al màxim.^[1]

Aquesta tesi es va iniciar emmarcada en un projecte de la Marató de TV3 d'aquella edició titulat: "Disseny racional, síntesi i caracterització d'anàlegs d'opiorfina i M6G: vers un millor coneixement dels mecanismes del dolor", que tenia com a finalitat contribuir al descobriment de nous fàrmacs analgèsics.^[2]

I.1. El dolor

Segons la definició de l'associació internacional per l'estudi del dolor, el dolor és una experiència sensorial i emocional desagradable associada amb dany tissular real o potencial.^[3] El dolor motiva l'individu a retirar-se de situacions perjudicials, per protegir la part del cos afectada, i generar records per evitar experiències similars en el futur.^[4] La majoria del dolor es resol ràpidament un cop l'estímul dolorós s'ha eliminat i es guareix la

lesió, però de vegades, el dolor persisteix malgrat l'eliminació de l'estímul i l'aparent curació del cos o, altres vegades, el dolor sorgeix en absència de qualsevol estímul detectable, dany o malaltia.^[5] Quan la durada del dolor és superior als 3 mesos, es considera crònic. Els processos patològics de dolor crònic solen tenir un inici gradual o mal definit, prosseguir sense disminuir i es poden agreujar amb el temps.

El dolor crònic és un camp poc explorat en recerca ja que es considera un possible símptoma de diverses malalties. És important reconèixer que el dolor és un problema per si mateix, no només un indicador d'un dany o malaltia subjacent, sinó una càrrega per als individus que ho pateixen, els seus familiars i per la societat en general. Doncs el dolor continu pot destruir la qualitat de vida de una persona provocant-li patiment físic i disminucions de la seva capacitat funcional, però també augmentant estats emocionals negatius com l'ansietat, l'estrès o la depressió, canvis de personalitat malmetent les seves relacions socials i limitant les seves possibilitats laborals, creant restriccions econòmiques a l'individu i al seu entorn familiar.^[6]

Epidemiològicament, segons les estimacions publicades pel NIH (*National Institute of Health* d'Estats Units d'Amèrica) a principis d'aquest segle, dels 250 milions d'habitants d'Estats Units d'Amèrica 90 milions patien dolor (50 milions dolor agut i 40 milions dolor crònic). D'aquests, 22 milions es troben parcial o totalment discapacitats. La *American Pain Society* ha estimat que el cost acumulat de l'assistència sanitària, la discapacitat i la pèrdua de productivitat associades al dolor al seu país ascendeix a més de 90.000 milions de dòlars anuals.^[7]

En dades més properes, segons l'enquesta del Departament de Salut de la Generalitat de Catalunya realitzada l'any 2011, aproximadament un 12% de la població general (875.000 persones) ha limitat les seves

activitats habituals per algun problema de salut crònic durant el darrer any. Pel que fa a les dimensions per valorar la qualitat de vida relacionada amb la salut, aquesta població valora el seu estat de salut com a regular o dolent per patir dolor (72%), ansietat o depressió (47%), manca de mobilitat (45%), tenir dificultats per dur a terme les activitats quotidianes, com ara treballar, estudiar, fer les feines de la llar o activitats de lleure, etc. (36%) o problemes en la seva cura personal, com ara vestir-se i rentar-se (19%).^[8]

Per millorar la qualitat de vida dels pacients cal que l'alleujament del dolor en si, com a malaltia, esdevingui un objectiu terapèutic.

I.2. Mecanismes del dolor

Neurofisiològicament, hi ha tres zones principals en el mecanisme de la transmissió del dolor: el sistema nerviós perifèric, la medul·la espinal i el cervell. A la perifèria, la capacitat de resposta dels receptors del dolor es veu reforçada per la presència de les prostaglandines que se segreguen en resposta a un trauma del teixit. El senyal dolorós es transmet pel sistema nerviós fins a la medul·la espinal i d'aquí als centres superiors del cervell, on afecta a diferents zones. A la formació reticular, els estímuls de dolor poden provocar canvis fisiològics com ara evocar l'excitació, augmentar la freqüència cardíaca, la pressió arterial, la respiració, etc. És al tàlem i a l'escorça cerebral on es materialitza la percepció o consciència del dolor. A partir de la recepció del senyal dolorós, el dolor es pot regular o, fins i tot, suprimir per acció de les vies modulatòries descendents. En concret, el cervell produeix compostos analgèsics endògens que s'uneixen als receptors opioides per activar aquestes vies.^[9] L'estudi dels fenòmens moleculars i de les pròpies

molècules implicades en la unió dels receptors opioides i els seus lligands ha sigut de particular interès en aquest treball de tesi.

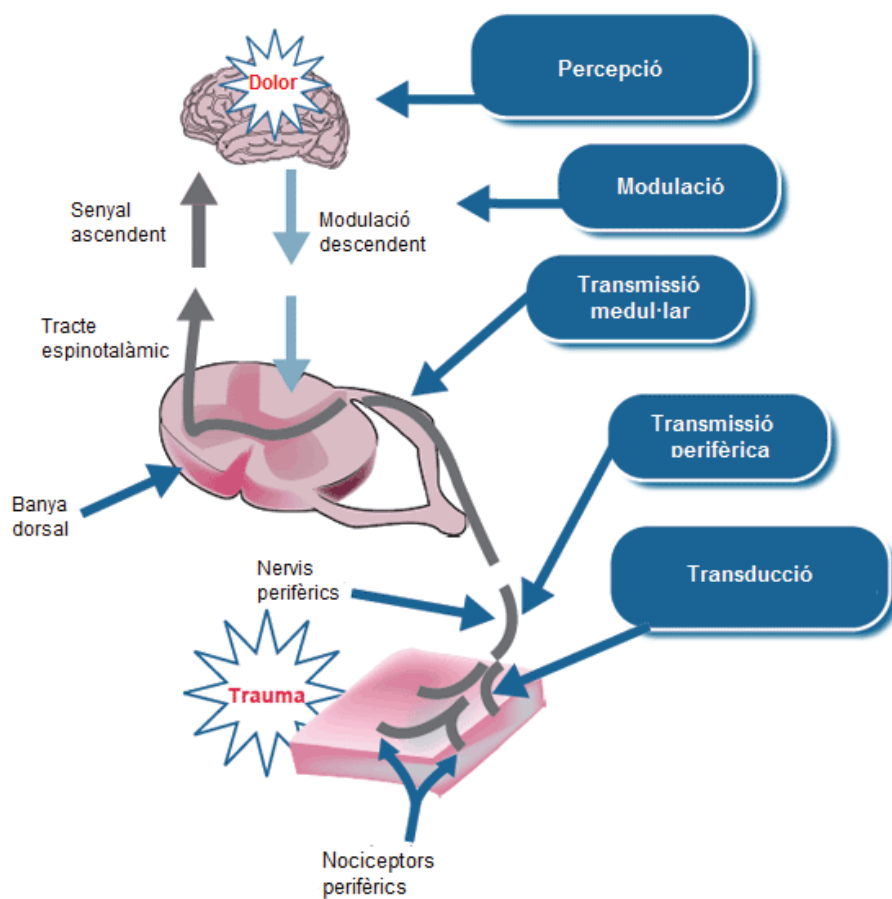


Figura I.1. Diagrama del mecanisme de funcionament del dolor. (Adaptat de la web de Medscape)

I.3. Fàrmacs analgèsics

Per lluitar contra el dolor disposem de fàrmacs analgèsics i entenem per analgèsia la disminució o l'absència de la sensació de dolor sense pèrdua de consciència.

Al 1986, la Organització Mundial de la Salut (OMS)^[10] va presentar una escala analgèsica com a guia de prescripció de fàrmacs que els metges podrien utilitzar durant els tractaments del dolor causat per càncer.^[11] A l'actualitat aquesta guia és la més emprada amb un índex de satisfacció dels pacients entre el 70% i el 80%^[12] i això fa que aquesta mateixa guia sigui aplicada a pacients de dolor crònic causat per altres patologies.

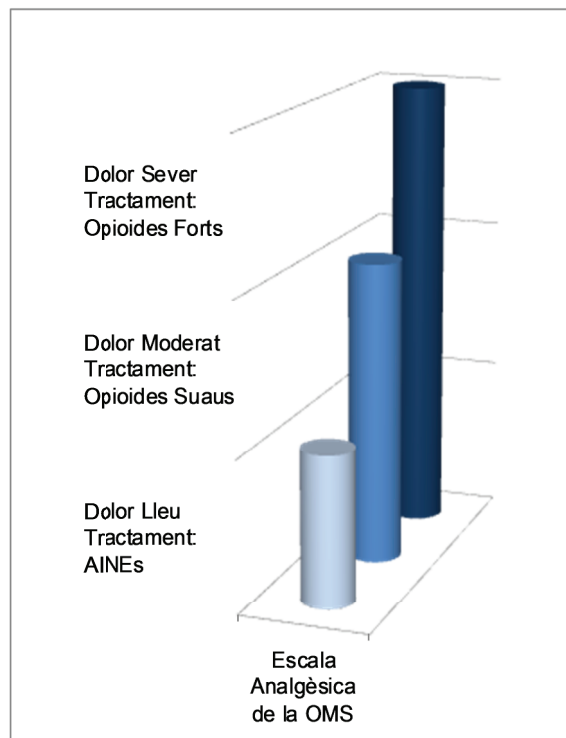


Figura I.2. Escala analgèsica de la OMS.

En aquesta escala, els nivells de dolor es classifiquen per la seva intensitat i es passa d'un tractament a un altre segons l'augment de la intensitat del dolor i la tolerància als fàrmacs que es desenvolupa al llarg del tractament. Els fàrmacs indicats per a cada nivell són els següents:

- Pel dolor lleu, o en un estadi inicial, s'empren fàrmacs d'acció perifèrica que inhibeixen la síntesi de prostaglandines, habitualment antiinflamatoris no esteroïdals (AINEs).
- Pel dolor moderat s'empren opiacis suaus com a analgèsics centrals dèbils, amb acció en els receptors opioïdes. Aquests presenten una moderada activitat analgèsica, poca potència depressora del sistema nerviós central i sense capacitat per provocar farmacodependència.
- Pel dolor sever o pels pacients amb tolerància als tractaments anteriors, s'empren opiacis forts com a analgèsics centrals forts, amb acció en els receptors opioïdes. Els efectes secundaris d'aquests són molt greus i inclouen entre d'altres tolerància, dependència, problemes respiratoris i restrenyiment.

AINEs	Opiacis suaus	Opiacis forts
Ibuprofè	Tramadol	Morfina
Paracetamol	Codeïna	Metadona
Àcid <i>O</i> -acetilsalicílic	Oxicodona	Fentanil

Taula I.1. Llistat de fàrmacs emprats habitualment a cada graó de l'escala del dolor.

El problema principal d'aquesta escala rau en la manca de bons fàrmacs amb activitat intermèdia entre els antiinflamatoris i els medicaments opiacis. En els últims anys, hi ha hagut un cert progrés i

s'ha desenvolupat algun medicament amb un mecanisme d'acció diferent. Aquest va ser el cas del pèptid *Ziconotide* o Prialt, que té el seu origen en una neurotoxina provinent de cargol marí *Conus magus*^[13] que bloqueja la transmissió del senyal dolorós, tancant els canals de sodi de les cèl·lules nervioses. No és una gran alternativa, doncs és necessari aplicar-lo per administració directa per via intratecal.^[14]

Pel que fa a l'altre extrem de l'escala, la recerca de medicaments amb acció opioide amb millors perfils farmacològics que els actuals, s'ha vist àmpliament dificultada per la manca de coneixements estructurals dels receptors opioides que ha impedit aplicar tot el potencial que ofereixen les tècniques modernes de descobriment de fàrmacs com ara el disseny de fàrmacs assistit per ordinador. Amb aquesta doble perspectiva aquest treball de tesi doctoral ha volgut descobrir, per una banda, nova informació estructural dels receptors opioides i aportar nous coneixements útils pel disseny de candidats a fàrmacs que actuïn sobre els receptors opioides. Per l'altra banda, ha volgut contribuir al descobriment de fàrmacs que tinguin una activitat intermèdia entre els AINEs i els opiacis i que actuïn com inhibidors de la degradació enzimàtica d'opioïdes endògens com les encefalines.

Objectius

Els objectius d'aquest treball de tesi doctoral s'emmarquen en un projecte més ampli i multidisciplinar enfocat al descobriment de potencials fàrmacs analgèsics i utilitzant les tècniques actuals de disseny racional com són la modelització molecular basada en dades estructurals de difracció de raigs-X o RMN, cribratge farmacològic i síntesi química.

Els objectius concrets corresponents al treball de la tesi han estat fonamentalment els de síntesi química prèviament guiada per les etapes corresponents de modelització i disseny assistit pel cribratge farmacològic, així com de millora dels coneixements sobre les dianes terapèutiques escollides, aportant nova informació al camp de l'analgèsia i assolint nous compostos que puguin ser optimitzables en un futur.

D'una banda s'ha volgut millorar el coneixement disponible del receptor opioide per entendre millor la seva conformació, el seu comportament i el seu centre actiu. Per arribar a aquesta fita, s'han dut a terme estudis proteòmics del receptor i modificacions químiques sobre aquest, optimitzant-ne primer la metodologia amb proteïnes menys complexes. També s'han sintetitzat diferents sèries d'anàlegs de lligands naturals d'aquests, derivats d'encefalines, endomorfines i Leu-encefalines per tal de estudiar-ne l'afinitat respecte el receptor opioide aplicant-hi modificacions, com són la glicosilació i l'halogenació i comparant el resultats obtinguts amb estudis computacionals..

De l'altra, s'ha explorat una nova ruta de recerca de compostos analgèsics basada en la inhibició de les encefalinases. Aquesta nova

estratègia terapèutica es basa en comprendre millor com un compost anomenat opiorfina inhibeix de manera dual els dos enzims que degraden les encefalines, utilitzant l'aproximació basada en el lligand per aportar nova informació a la manca de dades estructurals disponibles. Això s'ha dut a terme mitjançant estudis de relació estructura-activitat sintetitzant-ne diferents anàlegs per analitzar la importància de cada posició de la cadena peptídica d'opiorfina, tant intuïtivament com amb ajuda d'eines computacional, partint d'un Alascan i de fragments de la pròpia opiorfina i analitzant més a fons les posicions més rellevants per a la inhibició *in vitro*.

Capítol 1.

Estudis estructurals del receptor opioide

1.1. Introducció

Els receptors opioïdes (RO) pertanyen a la família dels receptors de membrana acoblats a proteïna G (GPCR), que són glicoproteïnes complexes integrants de la membrana cel·lular amb set dominis transmembrana. Els RO es troben distribuïts àmpliament pel cervell, la medul·la espinal i el tracte digestiu i són els responsables de l'activitat analgèsica tant de compostos opiacis exògens com de pèptids endògens.

- **Història del descobriment i caracterització funcional i estructural del receptor opioide**

Fou cap als anys 60, molt abans del descobriment dels primers pèptids opioïdes endògens (1975), que la comunitat científica es va començar a plantejar l'existència de llocs d'unió específics per la morfina i els seus anàlegs. Com a primer pas va ser necessari acceptar la contradicció aparent que a l'organisme humà podrien existir llocs d'unió específics per substàncies d'origen vegetal.^[15] A partir de lligands marcats radioactivament, es van poder identificar experimentalment aquests receptors en diferents estudis realitzats als anys 70.^[16]

L'existència de diferents tipus de receptors opioïdes va ser proposada per primera vegada per Martin^[15] en base a les interaccions entre morfina i nalorfina.^[17] Posteriorment, amb l'evidència experimental

produïda pel mateix Martin, els receptors de morfina es van anomenar μ i els de nalorfina κ , per la seva afinitat per la Ketazocina, un derivat del benzomorfa.^[18] Després del descobriment de les encefalines, el tercer membre de la família de receptors d'opioides va ser proposat per Kosterlitz i es va anomenar δ .^[19] Anys més tard, encara se'n va identificar un quart, selectiu pel pèptid analgèsic nociceptina/orfanina FQ^[20] que va rebre el nom de NOP o ORL1.^[21]

Malgrat ser identificats des de principis dels anys 70, no fou fins a la dècada dels 80 i després de nombrosos intents, que es van aconseguir purificar aquests receptors a partir d'extractes de membranes.^[22] De la mateixa manera, va ser necessària una dècada més per aconseguir clonar-los en cèl·lules de manera funcional.^[23] Aquesta eina unida a la descoberta de varies dotzenes de pèptids opioides endògens^[24] ha propiciat extensos estudis de relació estructura-activitat (SAR) tant de lligands opiacis com peptídics dels RO.^[25]

A partir d'aquesta fita, un dels grans objectius en aquest camp va consistir en obtenir l'estructura cristal·logràfica dels receptors per poder dissenyar els lligands *in silico* de manera racional. De nou, la seva complexitat estructural ho va dificultar àmpliament i l'estudi per difracció de Raigs X dels receptors opioides va esdevenir la recerca del Sant Grial dins del món de la cristal·lografia.^[26] Van ser necessaris encara 20 anys més, fins el 2012, any en el que es van publicar de forma simultània a la revista *Nature*^[27] quatre estudis que desvetllaven les estructures cristal·logràfiques que corresponen als quatre subtipus de RO: μ ^[28], κ ^[29], δ ^[30] i ORL1^[31]. Aquestes estructures contenen enllaçats diferents morfinòides o antagonistes opiacis. Així, el receptor μ ha estat cristal·litzat unit de forma covalent al morfina β -funaltrexamina (PDB ID: 4DKL)^[28]. En canvi, les estructures cristal·logràfiques dels altres

receptors han estat determinades en presència de lligands no covalents tals com el naltrindole pel receptor δ (PDB ID: 4EJ4),^[30] el JDTic pel receptor κ (PDB ID: 4DJH)^[29] i el peptidomimètic compost 24 pel receptor ORL1 (PDB ID: 4EA3)^[31].

Aquestes estructures ofereixen molts detalls moleculars de la unió lligand-receptor i de la seva especificitat i també són unes eines importants per a la descoberta de compostos més eficients a nivell terapèutic. No obstant, al igual que en el cas de les estructures cristal·logràfiques de la majoria de GPCRs descrites, les quatre estructures dels receptors publicades corresponen a formes modificades dels receptors per tal d'estabilitzar el receptor en una conformació específica que pugui facilitar la cristal·lització. A més a més, aquests lligands bloquegen el receptor en una conformació inactiva i les estructures obtingudes no concorden amb les que activarien les vies de senyalització analgèsiques. En resum, malgrat els recents avenços que han proporcionat estructures cristal·logràfiques d'alta resolució de diversos GPCRs, incloent els RO, i de les dècades de treball SAR en lligands opioides, encara hi ha una escassetat de coneixement estructural detallat sobre la unió precisa dels opioides als seus receptors. Aquesta manca de detalls moleculars fa que l'èxit del disseny de lligands específics per als receptors encara sigui un repte i que el procés segueixi sent empíric en gran mesura. Molt possiblement serà necessari l'ús d'altres tècniques biofísiques i bioquímiques o computacionals per a una comprensió precisa de la base estructural i els mecanismes d'activació del receptor.^[32]

1.2. Objectius

Amb l'objectiu general de contribuir a un millor coneixement estructural de la topologia del receptor opioide, els objectius concrets en aquest capítol van consistir en:

- Emprar tècniques bioquímiques per posar a punt una metodologia d'anàlisi proteòmica de proteïnes de grans dimensions o de membrana.
- Aplicar metodologies desenvolupades al grup per la modificació post-traduccionals de proteïnes patró per, posteriorment, analitzar-les segons els mètodes proteòmics optimitzats.
- Aconseguir suficient quantitat de receptor opioide per dur-hi a terme les tècniques desenvolupades.
- Aplicar els mètodes desenvolupats al receptor opioide.

1.3. Tècniques emprades

1.3.1. Tècniques proteòmiques

La proteòmica, per paral·lelismes amb la genòmica, es defineix com la ciència que estudia les proteïnes en totes les seves vessants (regulació, expressió, caracterització, estructura, entre d'altres).^[33] També es podria definir com l'anàlisi de proteïnes a gran escala, però, d'una manera exhaustiva, no només inclou la identificació o quantificació de proteïnes, sinó també la determinació de les seves modificacions, interaccions i funcions.

El disseny experimental d'un assaig proteòmic passa per diferents fases: la obtenció de la mostra, el seu fraccionament per obtenir proteïnes aïllades, la caracterització per espectrometria de masses (EM) i la interpretació de les dades obtingudes. Per cadascun d'aquests passos, serà necessària l'aplicació de diferents eines. Els exemples presentats a la figura 1.1 corresponen a les tècniques utilitzades sobre el RO a les mostres analitzades en d'aquesta memòria de tesi.

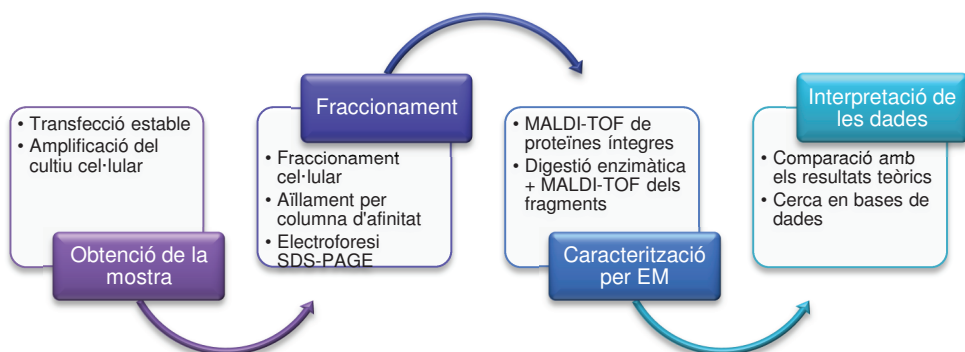


Figura 1.1. Diagrama de flux del procediment d'anàlisi proteòmic amb exemples de tècniques utilitzades a cada frase del procés.

En aquest procés, una de les eines més emprades és l'espectrometria de masses de proteïnes. Molt sovint no és tècnicament viable l'anàlisi de proteïnes senceres, per tant, cal recórrer a elaborar la proteïna i a una anàlisi indirecta. Així, cal emprar diferents tècniques de proteòlisi, normalment per digestió específica amb diferents enzims i diferents tècniques d'anàlisi per masses amb varis mètodes de ionització i de sistemes de detecció espectromètrics.

- *Tècniques de digestió enzimàtica*

L'anàlisi per espectrometria de masses de proteïnes complertes normalment no dona lloc a pics ben definits sinó a bandes amples degudes a la suma de les diferents masses isotòpiques. D'aquesta manera, l'error en determinar la massa exacta és força alt. Així mateix, en el cas de presentar alguna modificació en la seva estructura, seria impossible conèixer el punt on s'ha produït a partir de la massa de la proteïna completa. L'ús de digestions enzimàtiques en proteòmica soluciona aquests problemes recurrents permetent obtenir petits fragments de les proteïnes, amb pics de massa amb un error molt menor i, en molts casos, amb un extrem ja conegut per l'especificitat de l'enzim. La comparació entre les digestions teòriques de les proteïnes i els espectres de masses aconseguits permet assignar la seqüència correcta dels fragments obtinguts tant com la presència d'alguna modificació en el fragment on s'ha produït. Aquests fragments tindran longituds majors o menors segons la seqüència concreta de la proteïna hidrolitzada i els enzims utilitzats. L'interès de cara a l'anàlisi es troba en maximitzar el número de fragments entre 1000 i 3000 Da, ja que seran prou grans per ser detectats per EM MALDI-TOF i prou petits per ser extrets i volar correctament. De la composició de tots els fragments obtinguts, se n'extreu la cobertura de seqüència, que es tracta del

percentatge d'aminoàcids assignats respecte als aminoàcids totals a la proteïna analitzada.

Una estratègia interessant és la d'emprar més d'un enzim diferent per maximitzar la cobertura de seqüència obtinguda i la complementarietat de les dades entre aquests. L'enzim més utilitzat en proteòmica és la tripsina, que escindeix selectivament en l'extrem *C*-terminal de Lys o Arg, sempre que no estiguin seguides de Pro. Aquest enzim permet obtenir talls en les zones hidrofíliques de les proteïnes, ja que aquests aminoàcids bàsics es troben presents majoritàriament en dominis exposats al medi aquós. La digestió enzimàtica també es pot combinar amb una digestió química amb bromur de cianogen (BrCN), que afegeix trencaments a l'extrem *C*-terminal de Met, normalment presents en zones hidrofòbiques. Un altre enzim d'interès és la quimotripsina, que trenca de forma selectiva els enllaços peptídics a l'extrem *C*-terminal d'aminoàcids aromàtics com Phe, Tyr i Trp. Així permet obtenir talls en les zones hidrofòbiques de les proteïnes, doncs aquests aminoàcids conformen els dominis més hidrofòbics com poden ser els transmembranals. Modificant la temperatura i temps de digestió, es pot aconseguir també obtenir digestions parcials dels fragments en casos on una digestió total donaria lloc a fragments massa petits per a la seva detecció.

Aquestes digestions també es poden realitzar segons dos tipus de metodologies: en gel o en solució. La digestió en gel permet fer una primera separació per electroforesi en SDS-PAGE en condicions desnaturalitzants, així com també facilita la manipulació de les mostres en els diferents passos de reducció i alquilació de les Cys abans de la digestió i permet obtenir els pèptids digerits en absència de sals. La digestió en solució, en canvi, no necessita l'electroforesi, però és necessari tenir una mostra pura abans de començar. Tots els passos

següents es realitzen a la mateixa solució, de manera que caldrà eliminar les sals dels tampons per extracció en fase sòlida (SPE) per poder analitzar els pèptids obtinguts. Actualment, el mètode més utilitzat sol ser la digestió en gel, per la seva fàcil manipulació i per la millora en la sensibilitat donada per la concentració de la proteïna en una petita banda en el gel, tanmateix, si es donen seqüències llargues i hidrofòbiques pot resultar difícil extreure-les. Així doncs, a la literatura, treballant sobre receptors de membrana s'ha aconseguit millors cobertures de seqüència treballant en solució.^[34]

En aquest treball de tesi s'han utilitzat ambdós mètodes, en gel i en solució, així com també s'han fet digestions amb tripsina o quimotripsina simultàniament per complementar els resultats d'ambdues tècniques.

- *Tècniques d'espectrometria de masses MALDI-TOF*

L'espectrometria de masses (EM) és un mètode analític per mesurar la relació entre la massa i la càrrega (m/z) de les molècules analitzades. Aquesta es realitza per ionització de les molècules, separació dels ions resultants segons la seva relació m/z i detecció de l'abundància d'aquests ions. Als anys 80 van aparèixer les tècniques de ionització suau com l'electrospray (ESI, *Electrospray ionization*) o la ionització per desorció amb làser assistida per matriu (MALDI, *Matrix-assisted Laser Desorption Ionization*). Aquestes tècniques van produir un gran avenç en l'espectrometria de masses i van permetre l'estudi de biomolècules com les proteïnes. La tècnica d'EM utilitzada en aquest treball per l'anàlisi de les proteïnes d'interès i els pèptids obtinguts per digestió ha sigut la de MALDI-TOF. L'EM MALDI-TOF va ser desenvolupada als anys 80^[35] i molt emprada en l'estudi de biomolècules.^[36] En aquesta tècnica l'analit es cocrystal·litza amb una molècula orgànica de baix pes molecular anomenada matriu. D'aquesta forma, els analits són ionitzats

de forma suau per l'acció del làser, sent així desorbitats. A continuació passen a l'analitzador de masses en el que són separats d'acord a la seva m/z . L'analitzador de masses emprat en aquest treball va ser el de temps de vol (TOF, *Time of Flight*) en mode lineal o amb reflector. L'ús de reflector en l'analitzador augmenta el recorregut de les mostres dins del tub de temps de vol, fenomen que millora la resolució de molècules petites com són els pèptids.

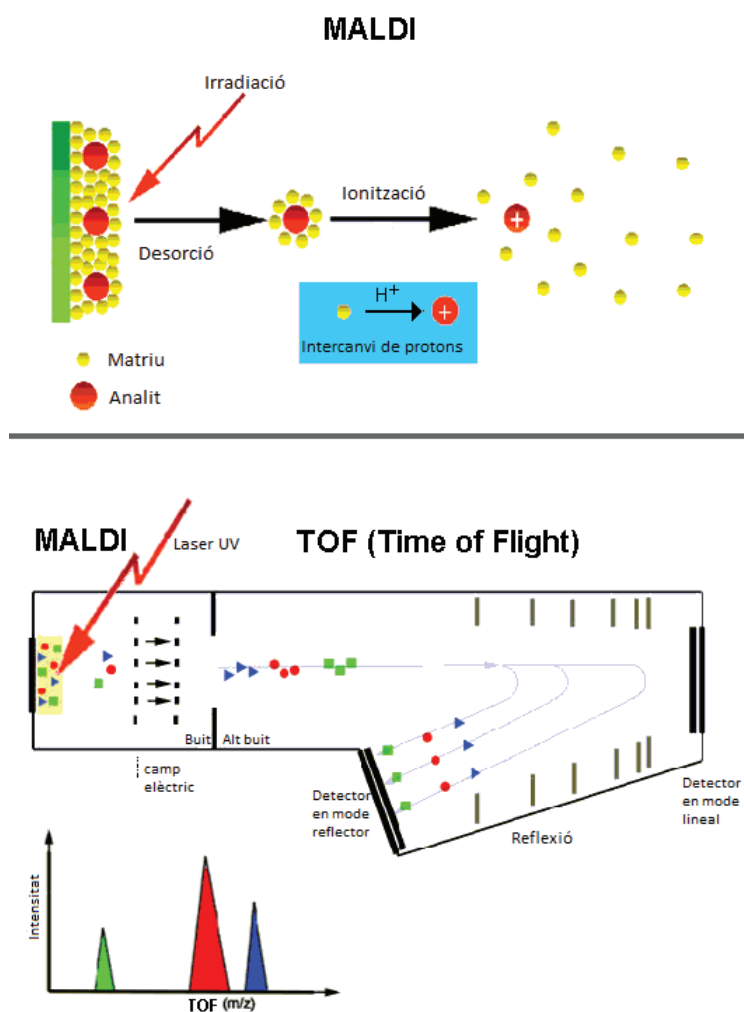


Figura 1.2. Representacions gràfiques del procés d'ionització i temps de vol del MALDI-TOF, imatge adaptada de la Universitat de Nijmegen.

Per l'anàlisi de pèptids se sol utilitzar més freqüentment com a matriu l'àcid α -ciano-4-hidroxicinnàmic (α CN), però comparativament, en el nostre estudi es va trobar millor sensibilitat amb l'àcid 2,5-dihidroxibenzoïc (DHB). D'una altra banda, la matriu emprada per proteïnes íntegres és l'àcid sinapínic (SA).

Per l'anàlisi de temps de vol de proteïnes, el nostre equip de MALDI-TOF es va utilitzar en mode lineal, mentre que per l'anàlisi de pèptids es va emprar en mode reflector. Les condicions concretes es troben descrites a l'apartat de materials i mètodes corresponent.

1.3.2. Modificacions químiques de biomolècules

Malgrat el gran desenvolupament assolit per la biologia molecular, encara avui hi ha modificacions en l'estructura de biomolècules complexes com les proteïnes i els àcids nucleics que no son a l'abast d'aquestes tècniques.

Fins avui les modificacions químiques realitzades sobre proteïnes es basen en quatre estratègies:

a) Les reaccions de bioconjugació d'aminoàcids naturals per la modificació i enginyeria de proteïnes, que inclouen mètodes clàssics de modificació, com l'alquilació de les Cys o la modificació de les Lys per modificacions selectives de l'amina primària^[37], i mètodes més nous que utilitzen reaccions organometàl·liques, com l'alquilació selectiva de lisines catalitzada per Ir^[38], l'acoblament oxidatiu entre dos Tyr catalitzat per Ru^[39] o la formació d'una sal de diazoni a partir d'un Trp catalitzat per Rh^[40].

b) Les reaccions bioortogonals d'aminoàcids no naturals de proteïnes, introduïts per manipulació genètica o modificació selectiva de la cadena proteica. Aquestes inclouen, per exemple, la química click^[41]

basada en la reacció de Huisgen^[42] entre alquils i azides, la de Diels Alder^[43] o la de Staudinger^[44] i d'altres tipus com la reacció de Suzuki-Miyaura^[45] catalitzada per Pd sobre iodo-Phe.

c) El marcatge amb sondes sobre etiquetes (*tags*) introduïdes per via genètica a la proteïna d'interès siguin enzims de gran grandària amb el mètode PRIME (*Probe incorporation mediated by enzymes*) o petits pèptids amb seqüències afins a la sonda.^[46]

d) Les reaccions de marcatge dirigides pel lligand (*affinity labeling*), on el lligand es col·locarà selectivament al centre actiu abans de realitzar-hi una reacció covalent d'acoblament. Aquestes es realitzen sovint amb fotoactivació, com en el cas de diazirines o benzofenones,^[47] o amb activació tèrmica, com en el cas d'epòxids.^[48]

Aquestes modificacions, que avui dia es poden aconseguir fins i tot *in vivo* sobre cèl·lules que mantinguin les seves funcions biològiques,^[49] poden tenir diferents aplicacions, des de realitzar modificacions selectives i detectables a la cadena peptídica que poden actuar com a nous punts d'ancatge,^[50] a aplicar sondes detectables per fluorescència o radioisòtops i, fins i tot, fusionar proteïnes o sintetitzar glicoproteïnes.^[42]

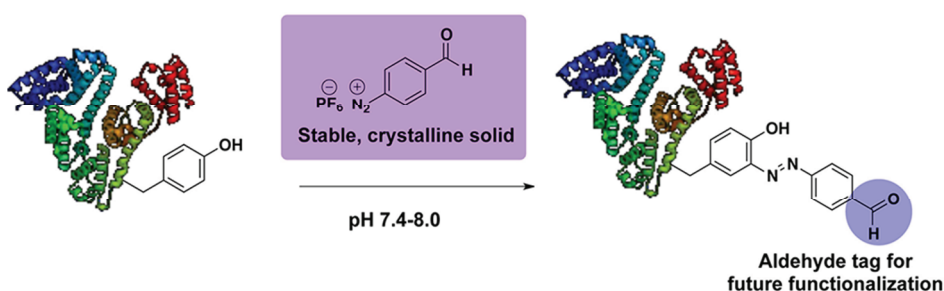


Figura 1.3. Exemple de funcionalització química de residus de Tyr en una proteïna descrit per Gavriluyk et al. sobre proteïnes.^[50]

En aquest projecte de tesi s'ha treballat per seguir el desenvolupament ja iniciat al grup de recerca d'un nou reactiu que permet modificar selectivament les Tyr més exposades de les proteïnes.

1.3.3. El reactiu de iodació IPy_2BF_4

El complex de coordinació de iodoni amb piridina, tetrafluoroborat de bis(piridina) iodoni(I) (IPy_2BF_4) o reactiu de Barluenga^[51], desenvolupat pel Prof. José Barluenga de la Universitat d'Oviedo, és un reactiu de iodació molt versàtil. En els darrers anys el nostre grup d'investigació ha estat treballant en col·laboració amb el grup d'Oviedo per tal de desenvolupar aquest reactiu com a eina bioquímica. Així, un dels primers progressos va ser la iodació electrofílica aromàtica en condicions suaus per Tyr i Phe en pèptids i proteïnes relativament petites.^[51-52] El reactiu de Barluenga reacciona instantàniament en condicions suaus de temperatura i medis de reacció tant orgànics com aquosos, i fins i tot és totalment selectiu per Tyr a pH fisiològic.

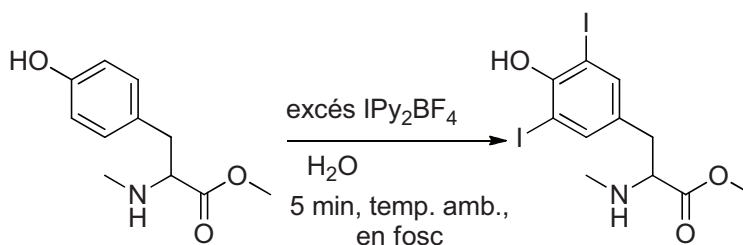


Figura 1.4. Reacció de iodació en aigua de residus de Tyr amb el reactiu de iodació de Barluenga.

Seguidament, el nostre grup va investigar la iodació de residus de tirosines en proteïnes i es va comprovar que efectivament es podia aplicar a la iodació de determinades proteïnes com la insulina bovina i el lisozim C. El reactiu es va emprar com a mesura de l'accessibilitat dels residus de tirosina en la superfície d'una proteïna com la β -glucanasa,

enzim globular de 24 KDa, i es va estudiar com afectava el grau de iodació a la seva activitat enzimàtica.^[52]

Seguint aquesta línia de recerca de desenvolupament del reactiu de Barluenga com una eina alternativa per efectuar modificacions químiques de biomolècules, en aquesta tesi es van voler implementar el desenvolupament metodològic d'aquest reactiu sobre sistemes proteics més complexes, com ara els RO, que són receptors de membrana de tipus GPCR.

1.4. Resultats i discussió

1.4.1. Posada a punt de tècniques proteòmiques amb proteïnes model

El primer pas en el desenvolupament metodològic que es pretén dur a terme va consistir en utilitzar proteïnes comercials com a model per posar a punt tècniques proteòmiques. Es va treballar sobre seroalbúmina bovina (BSA).

Per tal d'optimitzar les tècniques proteòmiques que s'aplicaran a les proteïnes objectiu del treball, es va utilitzar BSA de concentració coneguda com a control positiu per la realització d'electroforesi i tincions de bandes amb blau de Coomassie G-250, així com de model per les digestions tant en gel com en solució utilitzant tripsina o quimotripsina.

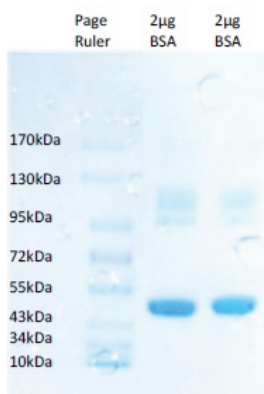


Figura 1.5. Gel d'electroforesi SDS-PAGE amb el marcador de pes molecular i les bandes de BSA.

A la figura 1.6 s'indiquen sobre la seqüència de BSA tots els possibles punts de tall amb tripsina, marcats amb taronja, i de quimotripsina, marcats amb blau.

10	20	30	40	50	60
MK W VT F ISLL	LL F SSA S SRG	VF R RD T H K SE	IA H R F K DLGE	EH F K GLVLIA	F SQ Y LQ Q CP F
70	80	90	100	110	120
DEHV K LVNEL	TE F A K TCVAD	ESHAGCE K SL	HTL F GDEL C K	VASL R ET Y GD	M AD C CE K QEP
130	140	150	160	170	180
ERNE C F LS H K	DDSPDL P K LK	PDPNTLCDEF	K ADE K K F WG K	Y LYE I ARR H P	Y F Y AP E LL Y Y
190	200	210	220	230	240
AN K Y NGV F Q E	CCQ A ED K GAC	LL P K IET M RE	K VLASSA R Q R	LRCAS I Q K FG	ER A L K AWS V A
250	260	270	280	290	300
RLS Q K F P K AE	F VEVT K LVTD	LT K V H K ECCH	GDLL E CAD D R	ADL A K Y ICDN	QDTISS K L K E
310	320	330	340	350	360
CCDKPL L E K S	HCIAEVE K DA	IPENLPPLTA	D F AED K DV C K	NY Q E A K DA F L	GSFL Y E Y SR R
370	380	390	400	410	420
HPE Y AVSVLL	R LA K E Y EATL	EECCA K DDPH	AC Y STV F DKL	K HLVDE P QNL	I K QNC D Q F E K
430	440	450	460	470	480
LGE Y G F QNAL	IV R Y T R K VPQ	VSTPTLVEVS	R SL G K VG T RC	CT K PESERMP	CTED Y LSLIL
490	500	510	520	530	540
NRLCVL H E K T	PVSE K VT K CC	TESLVN R RPC	F SAL T PDE T Y	VP K A F DE K L F	T FHADICTLP
550	560	570	580	590	600
DTE K Q I K K Q T	ALVELL K H K P	K ATEEQL K T V	M EN F VA F VD K	CCAADD K EAC	F AVEGP K LV V
STQTALA					

Figura 1.6. Seqüència de BSA amb els punts teòrics de digestió marcats: en taronja els punts de tall per tripsina i en blau els punts de tall per quimotripsina.

Es van realitzar experiments de digestió de BSA modificant les variables següents: el tipus d'enzim emprat i la seva aplicació (en gel o en solució), la proporció de poliacrilamida al gel, la incorporació d'un dissolvent orgànic al medi de digestió, l'ús de una segona digestió amb BrCN, la temperatura a 30 o 37°C i els temps de digestió entre 2 i 20h. El número de pèptids assignables detectats per comparació directa amb

la predicció, així com la cobertura de seqüència aconseguida es van considerar els paràmetres quantitatius a maximitzar, sense oblidar que també es desitjava una possible complementarietat entre diferents tècniques. Els EM es van introduir en el motor de cerca MASCOT de MatrixScience,^[53] que va comparar-los amb la base de dades Swiss-Prot, indicant la taxonomia adequada, per obtenir les puntuacions indexades a la taula de resultats.

A la taula 1.1 es mostren els resultats obtinguts, seguit de la figura 1.7 on es mostra la complementarietat de cobertura de seqüència entre digestions amb tripsina i quimotripsina. En les condicions òptimes per a cada un dels dos enzims i combinant els resultats, la cobertura total aconseguida és del 75,9%.

Enzim	Digestió	Temp.	Temps	Quantitat	Fragments assignats	Cobertura de seqüència	Puntuació de MASCOT
Tripsina	en gel 12%	30°C	20h	2µg	25	52%	301
Tripsina	en gel 6%	30°C	20h	2µg	18	41%	230
Tripsina	en gel 10%	37°C	3h	2µg	0	0%	0
Tripsina	en gel 10%	37°C	3h	0,5µg	5	10%	0
Tripsina	en solució	30°C	20h	4µg	29	52%	298
Tripsina	en solució	37°C	6h	2µg	10	29%	80
Tripsina	en solució	37°C	20h	2µg	11	26%	96
Tripsina	en solució	37°C	20h	2µg	18	26%	0
Tripsina	en solució amb 40%ACN	37°C	20h	2µg	2	4%	0
Tripsina + CNBr	en solució	37°C	20h	2µg	3	5%	0
Quimotripsina	en gel 12%	30°C	20h	2µg	16	51%	74
Quimotripsina	en gel 6%	30°C	20h	2µg	21	48%	170
Quimotripsina	en gel 10%	37°C	3h	2µg	1	3%	0
Quimotripsina	en gel 10%	37°C	3h	0,5µg	0	0%	0
Quimotripsina	en solució	30°C	20h	4µg	0	0%	0
Quimotripsina	en solució	37°C	2h	2µg	8	13%	0
Quimotripsina	en solució	37°C	6h	2µg	19	29%	0
Quimotripsina	en solució	37°C	20h	2µg	19	34%	0
Quimotripsina	en solució 40%ACN	37°C	20h	2µg	0	0%	0

Taula 1.1. Resultats obtinguts amb els experiments proteòmics sobre BSA. A cada experiment s'indica l'enzim utilitzat, el medi on s'ha dut a terme, la temperatura i el temps de la digestió, la quantitat de proteïna utilitzada, els fragments assignats a la seqüència, la cobertura que aquests representen i la puntuació obtinguda en la cerca per MASCOT per la proteïna correcta.

10	20	30	40	50	60
MKVVTFISLL	LLFSSAYSRG	VFRRDTHKSE	IAHRFKDLGE	EHFKGLVLIA	FSQYLQQCPF
70	80	90	100	110	120
DEHVKLVNEL	TEFAKTCVAD	ESHAGCEKSL	HTLFGDELCK	VASLRETYGD	MADCCEKQEP
130	140	150	160	170	180
ERNECFLESHK	DDSPDLPKLK	PDPNTLCDEF	KADEKKFWGK	YLYEIARRHP	YFYAPELLYY
190	200	210	220	230	240
ANKYNGVVFQE	CCQAEDKGAC	LLPKIETMRE	KVLASSARQR	LRCASIQKFG	ERALKAWSVA
250	260	270	280	290	300
RLSQKFPAE	FVEVTKLVTD	LTKVHKECCH	GDILLECADDR	ADLAKYICDN	QDTISSKLKE
310	320	330	340	350	360
CCDKPILLEKS	HCIAEVEKDA	IPENLPPLTA	DFAEDKDVCK	NYQEAKDAFL	GSFLYEYSRR
370	380	390	400	410	420
HPEYAVSVLL	RLAKEYEATL	EECCAADDPH	ACYSTVFDKL	KHLVDEPQNL	IKQNCDOFEK
430	440	450	460	470	480
LGEYGFQNAL	IVRYTRKVPQ	VSTPTLVEVS	RSLGKVGTRC	CTKPESERMP	CTEDYLSLIL
490	500	510	520	530	540
NRLCVLHEKT	PVSEKVTKCC	TESLVNRRPC	FSALTPDETY	VPKAFDEKLF	TFHADICTLP
550	560	570	580	590	600
DTEKQIKKQT	ALVELLKHKP	KATEEQLKTV	MENFVAFVDK	CCAADDKEAC	FAVEGPKLVV
STQTALA					

Figura 1.7. Seqüència de BSA amb tots els fragments assignats durant els diferents experiments marcats. En taronja corresponen als fragments de digestió trípica, en blau als fragments de digestió quimotríptica i en vermell a la superposició d'ambdós tipus de fragments.

1.4.2. Iodació de proteïnes model

Es van escollir com a proteïnes model el lisozim C, el quimiotripsinogen A i la BSA. Els experiments de iodació sobre aquestes proteïnes model es van realitzar seguint la metodologia descrita en articles anteriors del grup,^[52] utilitzant diferents quantitats de IPy_2BF_4 . En el cas de la BSA, els resultats obtinguts es van comparar amb els obtinguts a altres articles de iodació de proteïnes.^[54]

- Iodació de lisozim C i quimotripsinogen A

El lisozim C i el quimotripsinogen A presenten seqüències més curtes que la BSA, de 147 aminoàcids i 245 aminoàcids cadascun. La raó per assajar models encara més senzills que la BSA era obtenir una cobertura de seqüència total o, almenys, observar totes les tirosines en l'anàlisi proteòmica. A les següents figures es pot observar la seqüència i els punts de tall per tripsina i quimotripsina de les dues proteïnes model.

10	20	30	40	50	60
MRSLLILVLC	FLPLAALGKV	FGRCELAAAM	KRHGLDN Y RG	Y SLGNWVCAA	KFESN F NTQA
70	80	90	100	110	120
TNRNTDGSTD	Y GILQINSRW	WCNDGRTPGS	RNLGNIPCSA	LLSSDITASV	NCA K KIVSDG
130	140				
NGMNAWVAWR	NRCKGTDVQA	WIRGCRL			

Figura 1.8. Seqüència de lisozim C. En taronja punts de tall de tripsina, en blau punts de tall de quimotripsina. Les Tyr presents es troben subratllades.

10	20	30	40	50	60
CGVPAIQPVL	SGLSRIVNGE	EAVPGSWPWQ	VSLQDKTGFH	FCGGSLINEN	WVVTAAHCGV
70	80	90	100	110	120
TTSDVTVVAGE	FDQGSSEKI	QKLKIAKVFK	NSKYNSLTIN	NDITLLKLST	AASFSTVSA
130	140	150	160	170	180
VCLPSASDDF	AAGTTCVTTG	WGLTRYTNAN	TPDRLQQASL	PLLSNTNCKK	YWGTKIKDAM
190	200	210	220	230	240
ICAGASGVSS	CMGDSGGPLV	CKKNGAWTLV	GIVSWGSSTC	STSTPGVYAR	VTALVNVVQQ
TLAAN					

Figura 1.9. Seqüència de quimotripsinogen A. En taronja punts de tall de tripsina, en blau punts de tall de quimotripsina. Les Tyr presents es troben subratllades.

Es va procedir a la iodació amb 2 equivalents del reactiu de iodació de Barluenga. Posteriorment, els crús de reacció es van digerir en solució amb tripsina i quimotripsina i es van analitzar per EM MALDI-TOF usant DHB com a matriu.

En la digestió amb tripsina del lisozim C es van assignar 7 fragments, els quals corresponien a una cobertura de seqüència del 48% i un d'ells incloïa la Tyr⁷¹, que no es va iodar a l'experiment. Per altra banda, en la digestió amb quimotripsina es van assignar 12 fragments, els quals corresponien a una cobertura de seqüència del 50%, incloent les 3 Tyr presents a la proteïna, de les quals només una, la Y⁴¹, s'observava iodada. Així doncs, en aquestes condicions de iodació (2 eq.) i emprant les tècniques proteòmiques indicades, de les 3 Tyr del lisozim C es van detectar totes, una d'elles iodada i les altres dos sense iodar.

L'anàlisi del quimotripsinogen A, va resultar ser de major complexitat, ja que la digestió amb tripsina activa el quimotripsinogen, alliberant

quimotripsina i produint pics d'autòlisi en la digestió. Així doncs, en l'anàlisi de la digestió amb tripsina, es van assignar 2 fragments de digestió tríptica i 15 més procedents de una segona digestió autolítica, els quals corresponien a un 57% de cobertura de seqüència i incloïen 3 de les 4 Tyr presents a la seqüència. D'aquestes 3 (Y⁹⁴, Y¹⁴⁶, Y1⁷¹), en diversos fragments es van trobar totes iodades de manera repetitiva, excepte en un d'ells, on la Tyr¹⁴⁶ es trobava sense iodar. Per altra banda, en la digestió directa amb quimotripsina, es van assignar 8 fragments, els quals corresponien a una cobertura de seqüència del 38% i incloïen solament la Tyr¹⁴⁶, en aquest cas iodada. En resum, en aquestes condicions, després de la iodació amb 2 eq. de reactiu, de les 4 Tyr del quimotripsinogen A se n'han detectat 3, dues d'elles iodades a tots els fragments on es troben i una d'elles iodada només en alguns fragments.

- *Iodació de BSA*

La BSA presenta 20 Tyr a la seva seqüència. Observant la seva estructura cristal·logràfica s'extreu que 15 es troben en dominis de α -hèlix i 5 en zones sense ordre, així mateix 13 tenen una posició més interna, mentre que les 7 restants es troben en posicions més exposades al solvent.

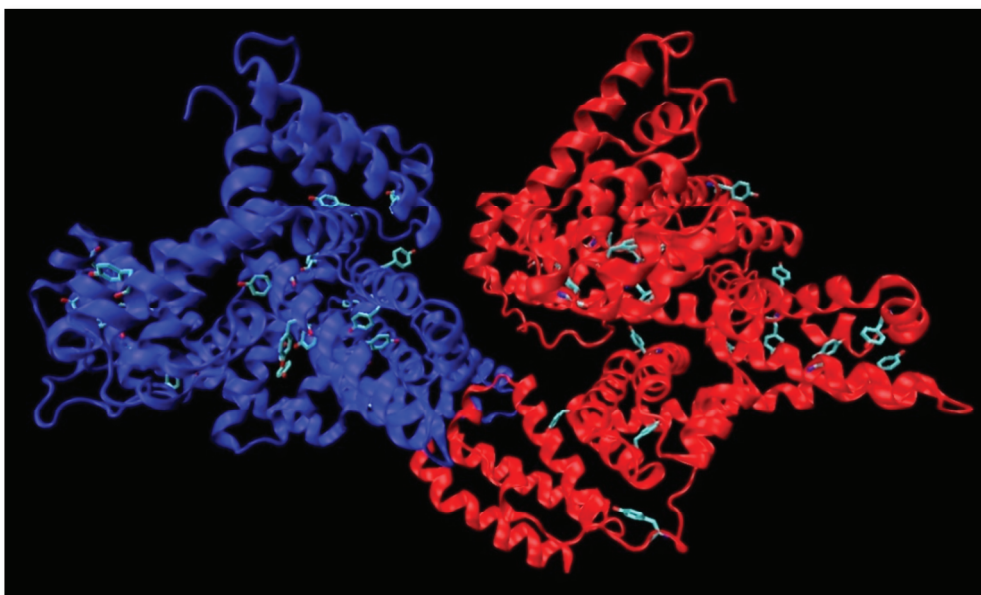


Figura 1.10. Imatge obtinguda durant la visualització amb el programa Visual Molecular Dynamics^[55] de l'estructura de BSA (PDB ID:4F5S) disponible al PDB.

Després de fer reaccionar la proteïna amb quatre proporcions diferents de reactiu (0,5; 1; 5 i 10 equivalents), es va realitzar una primera anàlisi per EM MALDI-TOF de la BSA patró i dels crús de reacció, prèviament purificats per ZipTip® de C₄, emprant SA com a matriu. Els equivalents de reactiu es van calcular tenint en compte la presència de 20 Tyr a la proteïna. A la següent composició d'espectres es pot observar una bona

correlació entre l'augment de massa de BSA amb l'augment d'equivalents de reactiu utilitzats.

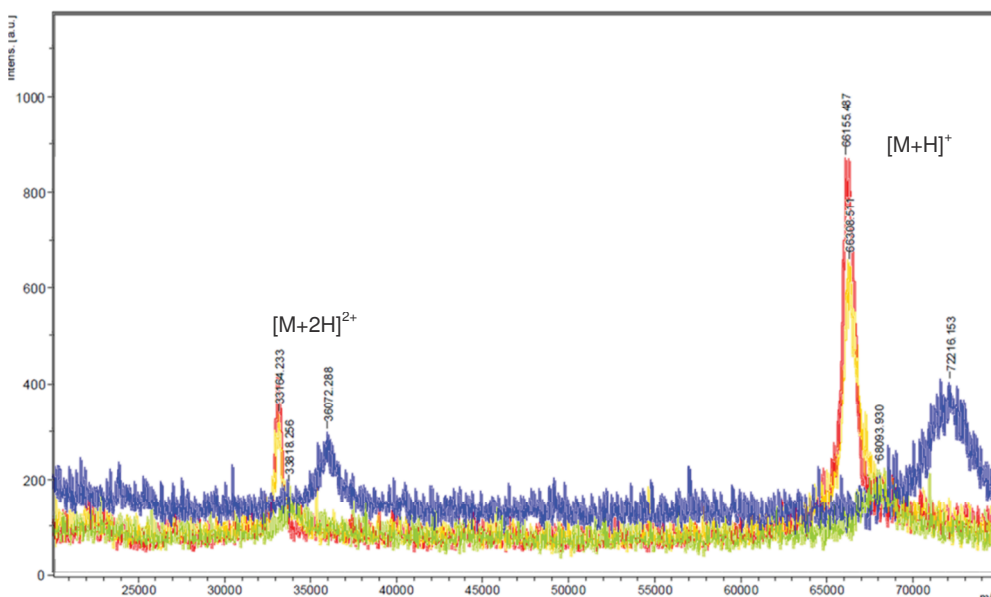


Figura 1.11. Espectres MALDI-TOF de BSA durant l'experiment de iodació. En vermell, la BSA original, en groc BSA amb 1 eq. de IPy₂BF₄, en verd BSA amb 5 eq. de IPy₂BF₄ i en blau BSA amb 10 eq. de IPy₂BF₄.

Seguidament, el patró de BSA i els diferents crus iodats es van digerir en solució separatament amb tripsina i quimotripsina i es van analitzar els pèptids corresponents per EM MALDI-TOF usant DHB com a matriu. A les següents taules es troben desglossats els resultats obtinguts en els 5 experiments realitzats indicant: cada fragment amb Tyr trobat ordenat per la seva posició dins la seqüència, les modificacions detectades en el fragment i la massa d'aquest. Les caselles buides indiquen l'absència del fragment corresponent en els espectres.

Fragment				Detecció als experiment				
Posició	Seqüència assignada	Modificació	Massa	Blanc BSA	BSA + 0,5eq IPy ₂ BF ₄	BSA + 1eq IPy ₂ BF ₄	BSA + 5eq IPy ₂ BF ₄	BSA + 10eq IPy ₂ BF ₄
45 - 65	GLVLIAFSQYLQQCP FDEHVK	CAM	2492,31	✓				
161 - 167	YLVEIAR	-	927,57	✓	✓	✓		
		+ 1	1053,45				✓	
		+ 2 I	1179,37				✓	✓
		+ 3 I	1305,23				✓	✓
		+ 4 I	1431,15				✓	✓
168 - 183	RHPYFYAPELLYY ANK	-	2045,07	✓	✓	✓		
184 - 204	YNGVFQECCQAED KGACLLPK	3 CAM	2487,14	✓				
341 - 359	NYQEAKDAFLGSF LYEYSR	-	2301,13	✓				
347 - 359	DAFLGSFLYEYSR	-	1567,79	✓	✓	✓		✓
360 - 371	RHPEYAVSVLLR	-	1439,86	✓	✓	✓		
		+ 1	1565,80				✓	✓
		+ 2 I	1691,70				✓	
387 - 399	DDPHACYSTVFDDK	CAM	1554,77		✓			
413 - 433	QNCDQFEKLGEYGFQNALIVR	CAM	2529,27	✓				
421 - 433	LGEYGFQNALIVR	-	1479,84	✓	✓	✓		
		+ 1	1605,79				✓	
		+ 2 I	1731,68				✓	
469 - 482	MPCTEDYLSLILNR	CAM	1724,86	✓	✓			
508 - 523	RPCFSALTPDETYV PK	CAM	1881,01	✓	✓	✓	✓	
		CAM, + 1	2006,92				✓	
		CAM, + 2 I	2132,81				✓	

Taula 1.2. Resum dels fragments amb Tyr detectats en els experiments de iodació després de la digestió amb tripsina. S'indica la posició del fragment detectat dins la seqüència, la seqüència assignada del fragment, les modificacions que conté: CAM (carboxamidometil a les Cys) i + I (nombre de iodacions de les Tyr), la massa del pic corresponent i l'experiment de iodació on van ser detectats indicat amb les marques de verificació.

Fragment				Detecció als experiment				
Posició	Seqüència assignada	Modificació	Massa	Blanc BSA	BSA + 0,5eq IPy ₂ BF ₄	BSA + 1eq IPy ₂ BF ₄	BSA + 5eq IPy ₂ BF ₄	BSA + 10eq IPy ₂ BF ₄
151 - 161	KADEKKFWGKY	-	1399,68	✓				
162 - 171	LYEIARRHPY	-	1317,67	✓				
163 - 165	YEI	+ I	550,14		✓	✓		
164 - 171	EIARRHPY	-	1041,59	✓	✓	✓		
178 - 180	LYY	+ I	584,17		✓			
179 - 201	YYANKYNGVFQEC CQAEDKGACL	+ 4 I	3291,56				✓	
274 - 287	LECADDRADLAKYI	+ I	1778,59				✓	
284 - 294	AKYICDNQDTI	CAM	1340,72	✓	✓	✓		
		+ I	1466,59				✓	
		+ 2 I	1592,46				✓	✓
339 - 355	CKNYQEAKDAFLG SFLY	+ I	2179,97		✓	✓		
355 - 364	YEYSRRHPEY	-	1399,77	✓				
356 - 369	EYSRRHPEYAVSV L	+ 4 I	2209,25				✓	
356 - 370	EYSRRHPEYAVSV LL	-	1818,88	✓				
		+ 4 I	2322,32				✓	
358 - 369	SRRHPEYAVSVL	-	1413,78	✓	✓	✓		
358 - 370	SRRHPEYAVSVLL	-	1526,84	✓	✓	✓		
		+ 2 I	1778,59				✓	
367 - 380	SVLLRLAKEYEATL	-	1605,90		✓	✓	✓	✓
371 - 380	RLAKEYEATL	-	1193,60	✓				
371 - 393	RLAKEYEATLEEC CAKDDPHACY	3 CAM	2829,41	✓				
377 - 393	EATLEECCA KDDP HACY	3 CAM	2068,76	✓				
411 - 424	IKQNCDQFEKLGE Y	CAM	1771,77	✓				
425 - 434	GFQNALIVRY	-	1180,77	✓				
433 - 441	RYTRKVPQV	+ I	1272,68			✓		
505 - 520	VNRRPCFSALTPD ETY	CAM	1925,89	✓				

Taula 1.3. Resum dels fragments amb Tyr detectats en els experiments de iodació després de la digestió amb quimotripsina. S'indica la posició del fragment detectat dins la seqüència, la seqüència assignada del fragment, les modificacions que conté: CAM (carboxamidometil a les Cys) i + I (nombre de iodacions de les Tyr); i la massa del pic corresponent i l'experiment de iodació on van ser detectats indicat amb les marques de verificació.

En resum, per les assignacions dels pics observats es pot concloure que l'ús de més equivalents del reactiu de iodació en les reaccions, augmenta proporcionalment la presència de Tyr que incorporen àtoms de iode a l'anell aromàtic, amb algunes posicions que no arriben a incorporar-ne cap tot i haver utilitzat 10 eq. d'excés. De les 20 Tyr presents a la seqüència de BSA, se'n va detectar el fragment corresponent a 18 d'elles, 10 corresponen a fragments que van incorporar iode, mentre que 8 corresponen a fragments que no van arribar a reaccionar. Es van analitzar aquestes tirosines sobre l'estructura cristal·logràfica i es va observar que de les 10 que van reaccionar, 6 corresponen a posicions més exposades i els altres 4 corresponen a posicions més internes, mentre que de les 8 que no van arribar a reaccionar, 2 presenten una posició exposada al dissolvent i les altres 6 es troben en posicions internes.

Comparativament amb altres posades a punt de metodologies de iodació per proteïnes,^[54] amb el reactiu IPy_2BF_4 en les condicions emprades no s'observen fragments corresponents a reaccions secundàries d'oxidació de metionines ni de iodació d'altres aminoàcids com podrien ser Phe o His. De manera que el resultat obtingut presenta una major selectivitat que altres mètodes desenvolupats a la bibliografia.

En conclusió, s'han posat a punt tècniques proteòmiques i de reacció de iodació amb el reactiu de Barluenga amb proteïnes model. Una d'elles, una proteïna globular com la BSA que representa un grau de complexitat important per la seva mida molecular, per presentar 20 restes de Tyr i, per tant, amb un gran nombre de possibles productes de iodació. S'han confirmat observacions prèvies d'aquesta línia de recerca que indiquen que, en general, es modifiquen prioritàriament els residus aromàtics de les Tyr que es troben més exposades al dissolvent.

1.4.3. Obtenció, estudis proteòmics i intents de iodació del receptor opioide

Tal com s'esmenta a l'apartat d'objectius, aquesta part del treball volia contribuir a un millor coneixement estructural del RO. La hipòtesi inicial que plantejàvem es basa en les propietats úniques del reactiu de iodació de Barluenga. Aquest reactiu es pot emprar en medis aquosos amb condicions de reacció suaus, reacciona selectivament, a gran velocitat i té un temps de vida curt en aquest medi, tot això permetria realitzar una iodació selectiva de les tirosines disponibles exposades a la superfície de la membrana cel·lular.

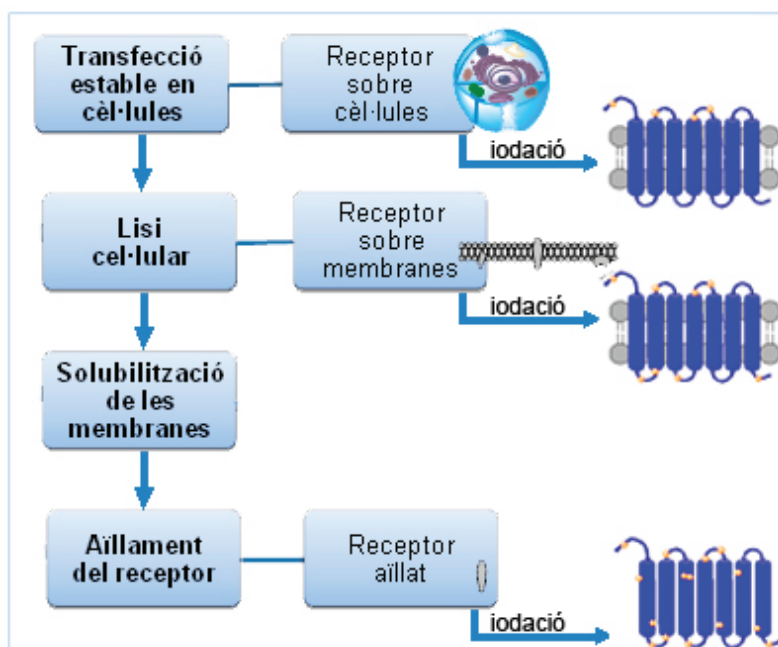


Figura 1.12. Diagrama de flux del procediment a seguir per l'aïllament del receptor i estat del receptor a cada pas per poder realitzar l'experiment de iodació.

D'aquesta manera, treballant sobre cèl·lules viables intactes es podrien incorporar àtoms de iode a les Tyr en posicions extracel·lulars, en canvi, sobre membranes lisades s'incorporarien sobre tirosines extracel·lulars i intracel·lulars i, en el cas de treballar sobre el receptor aïllat,

s'incorporarien a totes aquelles Tyr de la seqüència que estiguessin exposades al dissolvent. Així doncs, es podria tenir una evidència experimental sobre la posició real dels dominis del receptor respecte la membrana cel·lular.

Amb aquesta perspectiva, aquest treball també vol ser una contribució metodològica a la incipient àrea de la química que té com a objectiu fer modificacions químiques a components cel·lulars (p.ex. proteïnes) mentre formen part de cèl·lules vives. Dins d'aquest entorn voldríem demostrar que el reactiu de iodació de Barluenga té propietats que el farien adequat per aquestes finalitats.

1.4.3.1. Obtenció del receptor opioide

Els nostres col·laboradors habituals en el camp del dolor, el grup de la Dra. Raquel. E. Rodríguez del Instituto de Neurociencias de Castilla y León (INCyL) de la Universitat de Salamanca, ens varen proveir preparacions de RO de peix zebra transfectats en cèl·lules HEK i, posteriorment, purificats mitjançant electroforesi. Dissortadament, la quantitat de proteïna que genera aquest sistema d'expressió, que per una banda, és adequada per avaluar les constants d'afinitat de lligands als RO, en el nostre cas era insuficient per ser detectada pels mètodes convencionals de proteòmica que hem exposat anteriorment. Per confirmar-ho finalment, es va recórrer a assajar una alíquota diluïda de BSA en el mateix rang de concentració de proteïna que els RO subministrats, que tampoc es va poder detectar.

Per aquest motiu es va buscar la col·laboració amb el grup del Dr. Frank Talmont de l'Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale a Toulouse (França) que havia descrit sistemes d'alta expressió de RO.^[56] Es va realitzar una estada breu per poder treballar sobre cultius ja transfectats establement amb tècniques d'obtenció, quantificació i

purificació del receptor per tal de preparar diferents lots de receptor aïllat per continuar-ne el seu estudi al nostre laboratori.

- *Selecció de línies cel·lulars*

El sistema d'expressió més àmpliament utilitzat per obtenir proteïnes és el bacteri *Escherichia coli*, emprat anteriorment a la literatura per aconseguir diferents GPCRs en gran quantitat, però generalment els produeix com proteïnes no funcionals en forma de cossos d'inclusió.^[57] Altres sistemes d'expressió habituals i eficients, com els llevats *Saccharomyces cerevisiae* o *Pichia pastoris* expressen aquestes proteïnes en les membranes cel·lulars però aquestes són massa diferents a les de cèl·lules de mamífer, per la presència d'ergosterol enlloc de colesterol, així com també perquè tenen patrons de glicosilació diferents als habituals en mamífer.^[58] Així doncs, el millor sistema d'expressió disponible i optimitzat per expressar aquest tipus de receptors són cèl·lules de mamífer, que poden donar expressions de fins a 10 pmol/mg de proteïnes de membrana.^[58]

Les línies cel·lulars del nostre interès establement transfectades amb receptors opioïdes disponibles al laboratori del Dr. Talmont van ser CHO (cèl·lules ovàriques de hàmmster xinès, *Cricetulus griseus*) i SHSY-5Y (cèl·lules de neuroblastoma humà) amb un nivell d'expressió màxim per aquest tipus de cèl·lules. En el nostre cas, fins i tot aquesta quantitat va resultar ser baixa per dur a terme experiments de proteòmica, de manera que va ser necessari aplicar-hi sistemes de concentració.

- *Receptors opioïdes disponibles*

Els receptors opioïdes transfectats en les cèl·lules disponibles al laboratori del Dr. Talmont van ser receptors humans μ (μ OR) amb diferents etiquetes (*tags*) introduïdes a la seqüència per realitzar-ne la corresponent caracterització i purificació. Aquestes eren Myc-*tag* (de

seqüència EQKLISEEDL), T7-tag (de seqüència MASMTGGQMQG) i His-tag (de seqüència HHHHHH). Myc-tag i T7-tag es van emprar per caracteritzar per Western Blot la presència del receptor en les mostres, T7-tag també es pot emprar per purificar el receptor per immunoprecipitació, mentre que His-tag es va utilitzar per aïllar el receptor per cromatografia d'afinitat amb níquel.

<u>10</u>	<u>20</u>	<u>30</u>	<u>40</u>	<u>50</u>	<u>60</u>
MDSSAAPTNA	SNCTDALAYS	SCSPAPSPGS	WVNLSHLDGN	LSDPCGPNRT	DLGGRDSLCP
<u>70</u>	<u>80</u>	<u>90</u>	<u>100</u>	<u>110</u>	<u>120</u>
PTGSPSMITA	ITIMALYSIV	CVVGLFNGFL	VMYVIVRYTK	MKTATNIYIF	NLALADALAT
<u>130</u>	<u>140</u>	<u>150</u>	<u>160</u>	<u>170</u>	<u>180</u>
STLPFQSVNY	LMGTWPFGTI	LCKIVISIDY	YNMFTSIFTL	CTMSVDRYIA	VCHPVKALDF
<u>190</u>	<u>200</u>	<u>210</u>	<u>220</u>	<u>230</u>	<u>240</u>
RTPRNAKIIN	VCNWILSSAI	GLPVMFMATT	KYRQGSIDCT	LTFSHPTWYW	ENLLKICVFI
<u>250</u>	<u>260</u>	<u>270</u>	<u>280</u>	<u>290</u>	<u>300</u>
FAFIMPVLII	TVCYGLMILR	LKSVRMLSGS	KEKDRNLRI	TRMVLVVAV	FIVCWTPIHI
<u>310</u>	<u>320</u>	<u>330</u>	<u>340</u>	<u>350</u>	<u>360</u>
YVIIKALVTI	PETTFQTVSW	HFCIALGYTN	SCLNPVLYAF	LDENFKRCFR	EFCIPTSSNI
<u>370</u>	<u>380</u>	<u>390</u>	<u>400</u>	<u>410</u>	<u>420</u>
EQQNSTRIRQ	NTRDHPSTAN	TVDRTNHQLE	NLEAETAPLP	<u>LEQKLISEED</u>	<u>LNSAVDGGGH</u>
<u>HHHHHLARF</u>					

Figura 1.13. Seqüència del hμOR amb els Myc-tag i His-tag transfectat establement a cèl·lules CHO. Les etiquetes s'han subratllat dins la seqüència.

El receptor hμOR conté 15 Tyr i, com es pot observar al model simulat present a la figura 1.14, 3 Tyr es troben a l'espai extracel·lular, 9 en la zonatransmembranal i 3 més en l'espai intracel·lular. Observant la recent estructura cristal·logràfica descrita a la literatura^[28] (Figura 1.15),

57

- *Producció dels cultius cel·lulars*

Les soques seleccionades, en aquest cas cèl·lules CHO transfectades amb hμOR-Myc-His i cèl·lules SHSY-5Y transfectades amb T7-hμOR, es van plantar en plaques de Petri i van créixer adherides a la placa, es van fer canvis de medi de cultiu cada 24 hores fins arribar a una confluència del 90-100% observada al microscopi. Per fer el passi de cèl·lules amplificant el cultiu, es van desancorar amb tripsina de cada placa i es van plantar repartides en 4 plaques noves. El procediment es va repetir de manera iterativa.

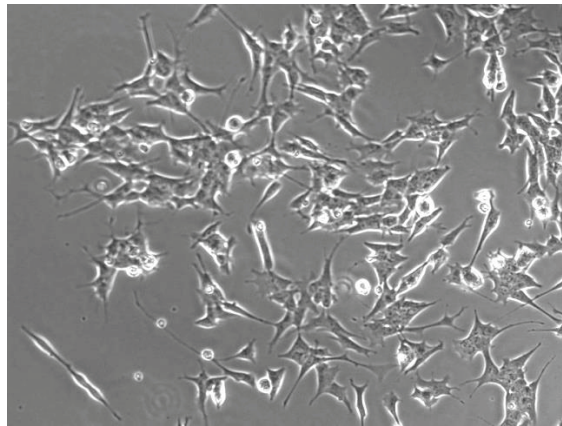


Figura 1.16. Cèl·lules SHSY-5Y, imatge d'arxiu del QueensCollege de Nova York.

- *Lisi dels cultius cel·lulars*

Es va realitzar un procés de lisi mecànica de les cèl·lules transfectades, seguit de la separació per centrifugació de la fracció cel·lular corresponent a les membranes. Els homogenats de membranes obtinguts es van emprar per comprovar la presència del RO a les mostres i per caracteritzar el nivell de transfecció cel·lular.

- *Detecció dels receptors en els cultius per Western Blot*

La presència de RO en els cultius es va seguir per Western Blot d'homogenats d'alíquotes dels cultius. El Western Blot es tracta d'una tècnica analítica usada per detectar proteïnes específiques en una mostra complexa determinada emprant anticossos específics.^[59] Per realitzar el Western Blot, primer es va dur a terme una electroforesi SDS-PAGE dels homogenats, seguida d'una transferència de les proteïnes a una membrana de difluorur de polivinilidè (PVDF). Sobre aquesta es va aplicar un anticòs primari que detectés específicament les *tags* presents al receptor i, posteriorment, es va amplificar la intensitat de la resposta afegint un anticòs secundari. Aquest, a més de detectar específicament l'anticòs primari, incorpora l'enzim peroxidasa de rave picant (HRP) que va ser revelada per quimioluminescència afegint un *kit* de solucions basades en luminol.

- *Quantificació de receptors funcionals en els cultius*

Per quantificar el receptor funcional present a les cèl·lules transfectades i comprovar que el nivell de transfecció es mantingui, es van realitzar assajos d'enllaç de lligand radioactiu (assajos de *binding*) sobre alíquotes d'homogenat de membranes procedents de cada placa. Tal com s'indica en la part experimental es va utilitzar el lligand antagonista [³H]diprenorfina.

Les plaques amb valors inferiors de constant d'afinitat a la placa precedent es van descartar del procés d'ampliació de cultius. Així mateix, només es van utilitzar en assajos posteriors les mostres amb major quantitat de receptor, és a dir, aproximadament 10 pmol/mg de proteïna.

- *Aïllament del RO*

Es van ajuntar els homogenats de membranes corresponents a diverses plaques de la mateixa soca amb un nivell de transfecció adequat. Es van solubilitzar amb l'ajut de detergents i agents desnaturalitzants^[56] i es va procedir a la seva purificació gràcies al *tag* introduït a la seqüència. En el cas de hμOR-Myc-His, es va emprar una columna d'afinitat de Ni, eluint diferents fraccions amb diferents concentracions d'imidazole i comprovant el contingut de cada fracció per electroforesi en SDS-PAGE.

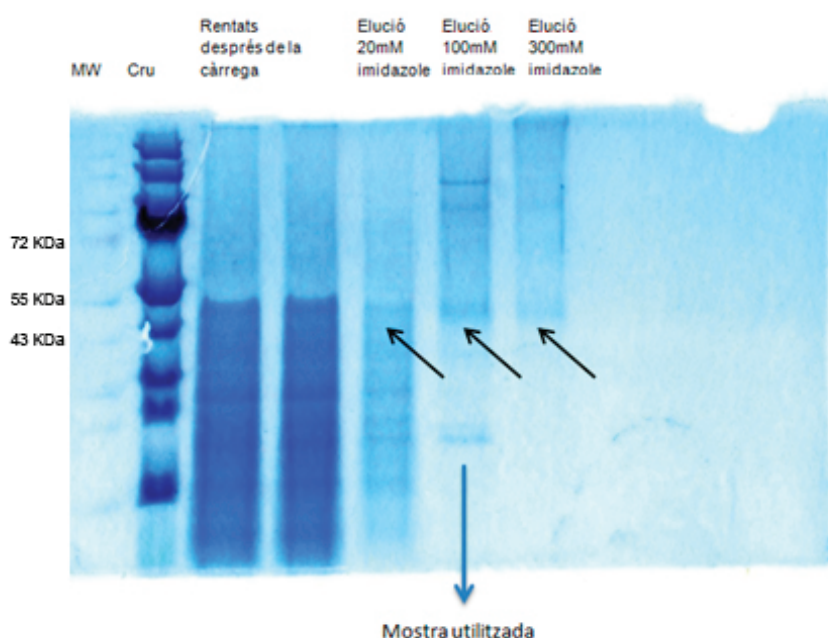


Figura 1.17. Electroforesi de les diferents fraccions eluïdes de la columna d'afinitat amb diferents concentracions d'imidazole. El RO presenta una massa de 44KDa. La fracció més enriquida en aquest va ser la de 100 mM d'imidazole.

- *Quantificació per BCA dels receptors en mostres purificades*

Les concentracions de RO en les mostres aïllades es van quantificar mitjançant l'assaig quantitatiu d'àcid bicinonínic (BCA). Aquest utilitza

una reacció colorimètrica amb coure per quantificar la concentració de cisteïnes, tirosines i triptòfan presents a la mostra^[60] i fa servir una mostra de concentració coneguda de BSA com a patró per la recta de calibratge.

Es va utilitzar el mètode descrit al kit per microplaca emprat per detectar concentracions de proteïna de 0,1 a 2 mg/mL i es va posar a punt una nova metodologia per augmentar el nivell de detecció en microplaca fins a 10 µg/mL.

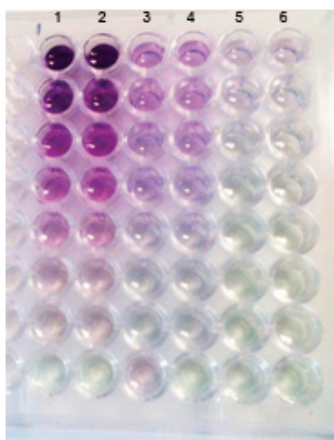


Figura 1.18. Foto de microplaca amb diferents dilucions de proteïna. A les dues columnes inicials, dilucions de BSA per realitzar la recta de calibratge. A les altres 4 columnes, diferents dilucions del receptor per quantificar-lo.

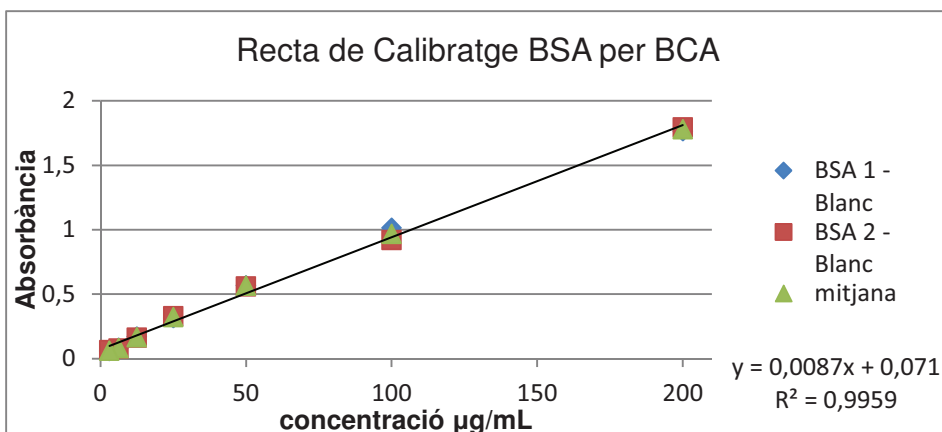


Figura 1.19. Recta de calibratge realitzada per BSA segons la concentració als pous de la microplaca i l'absorbància aconseguida a l'assaig.

Les concentracions obtingudes ens els diferents lots van ser entre 17 ± 4 µg/mL i 25 ± 3 µg/mL per mostres directament eluïdes per columna i de $1,8 \pm 0,2$ mg/mL per mostres concentrades segons els mètodes descrits més endavant.

1.4.3.2. Anàlisi proteòmica del receptor opioide

A la literatura es troben descrites anàlisis proteòmiques tant dels receptors opioïdes^[56, 61] com d'altres receptors de membrana de complexitat similar,^[34, 62] encara que amb caracteritzacions optimitzables, es van considerar un bon punt de partida pels experiments realitzats que es descriuen a continuació. Es va comptar amb la col·laboració del Dr. Francesc Canals i el Dr. Joan-Josep Bech del Laboratori de Proteòmica de l'Institut d'Oncologia de Vall de Hebron (VHIO) com a consultors per realitzar optimitzacions en aquest estudi.

- Concentració de mostres de receptor opioide

Tal com hem constatat amb els estudis amb BSA, per realitzar els assajos proteòmics, calia una concentració de mostra al voltant de 1 mg/mL de proteïna. Les mostres de RO obtingudes directament de les

columnes de purificació presentaven concentracions molt més diluïdes. El mètode emprat pel grup de Toulouse per concentrar la mostra després d'aïllar el receptor era per evaporació en Speed-Vac, aquest presentava el problema que el tampó en el que es trobava dissolta la mostra després del seu pas per columna contenia una elevada concentració de SDS, que augmentava en concentrar la mostra i, per tant, dificultava les digestions enzimàtiques en solució. Al mateix temps, el tensioactiu formava agregats amb el receptor implicant un comportament electroforètic normal.

Per això, es van posar a prova dos altres mètodes per concentrar la proteïna un cop purificada. El primer va consistir en l'ús d'un filtre de centrifugació Centricon (Millipore) de 3 KDa, que per centrifugació va separar una part del tampó, concentrant les proteïnes en menys volum sense concentrar sals ni detergents. L'altre va consistir en realitzar una precipitació amb acetona a -20°C sobre la mostra diluïda i redissoldre-la en menys volum de tampó i amb menys quantitat de detergent. Tots dos mètodes van millorar l'aspecte de les bandes aconseguides per electroforesi, indicant l'absència d'agregats a les mostres, i es van emprar comparativament a l'assaig proteòmic obtenint resultats molt similars.

- *Digestions enzimàtiques del receptor opioide*

El primer pas abans de dur a terme les digestions va ser la predicció dels punts de tall. Com s'observa a la figura 1.20, els de tripsina es donen bàsicament en zones fora de la membrana, deixant uns fragments molt llargs en els dominis transmembranals que possiblement donaran problemes en la seva anàlisi. Per altra banda, els punts de tall de quimotripsina es trobaran gairebé exclusivament en zones transmembranals, tal i com s'observa a la figura 1.21. Per aquests

motius va ser molt important considerar ambdós tipus de digestions doncs, com ja s'ha vist, proporcionen informació complementària.

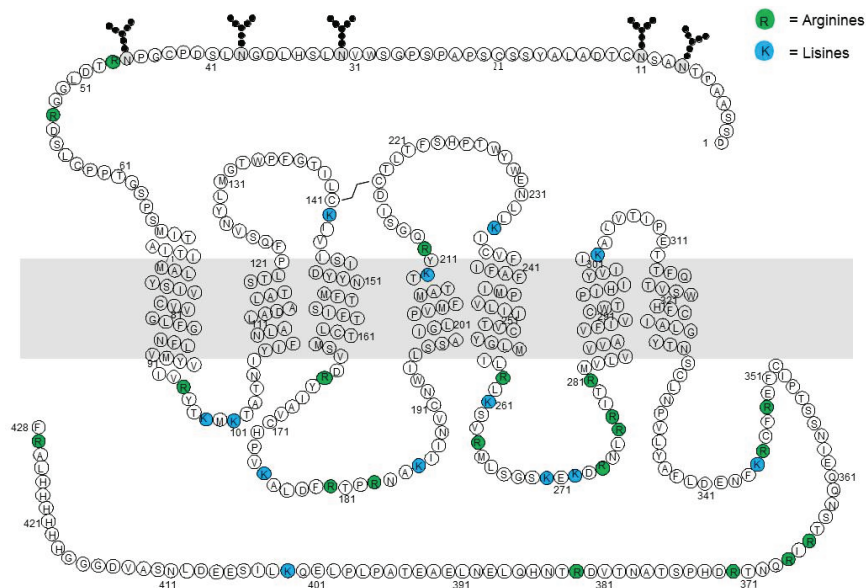


Figura 1.20. Predicció de punts de tall amb tripsina sobre el receptor hμOR-Myc-His. En verd apareixen les arginines i en blau les lisines.

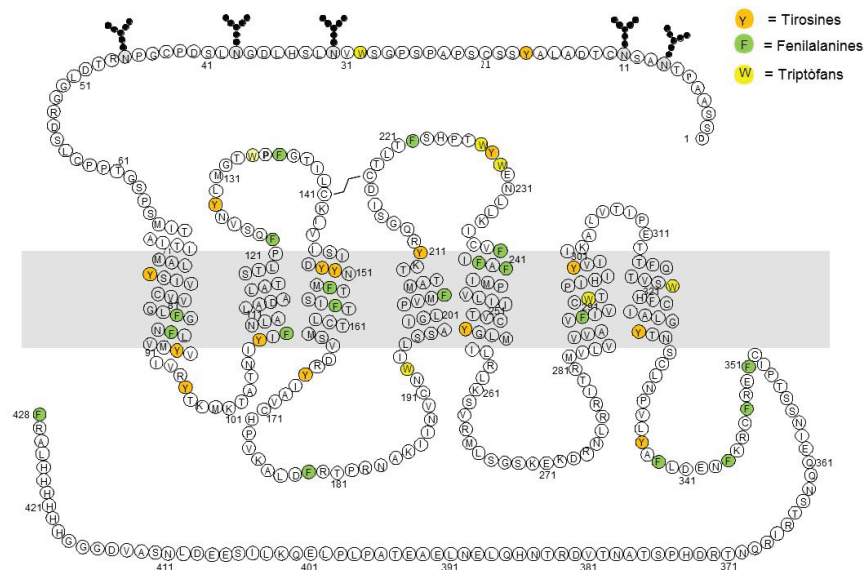


Figura 1.21. Predicció de punts de tall amb quimotripsina sobre el receptor hμOR-Myc-His. En taronja apareixen les tirosines, en verd les fenilalanines i en groc els triptòfans.

Es van realitzar diferents experiments de digestió per optimitzar variables com ara són: el mètode de concentració, el mode de fer les digestions (gel o solució), la proporció de poliacrilamida al gel, la possible addició d'urea i β -mercaptoetanol al tampó de càrrega de l'electroforesi, la incorporació d'un dissolvent orgànic al medi de digestió, l'ús de una segona digestió amb BrCN, la temperatura (30 o 37°C) i els temps de digestió entre 2 i 20h. El número de pèptids assignables detectats, així com la cobertura de seqüència aconseguida es van considerar els paràmetres quantitatius a maximitzar, sense oblidar que també es desitjava una possible complementarietat entre diferents tècniques. Els espectres de masses també es van introduir en el programa MASCOT (MatrixScience), que va comparar-los amb la base de dades Swiss-Prot, indicant la taxonomia adequada, per obtenir les puntuacions indexades a la taula.

A la taula 1.4 es mostren els resultats obtinguts, seguit de la figura 1.20 on es mostra la complementarietat de cobertura de seqüència entre digestions amb tripsina i quimotripsina. La cobertura total aconseguida fou del 47,8%.

Mètode de concentració	Enzim	Digestió	Temp.	temps	quantitat	fragments	Cob. Seq.	MASCOT
SpeedVac	Tripsina	en gel 12%	30°C	20h	2µg	0	0%	0
SpeedVac	Tripsina	en gel 12%	30°C	20h	8µg	0	0%	0
SpeedVac	Tripsina	en gel 6%	30°C	20h	2µg	0	0%	0
SpeedVac	Tripsina	en gel 6%	30°C	20h	8µg	0	0%	0
SpeedVac	Tripsina	en gel 6%	30°C	20h	8µg	0	0%	0
SpeedVac	Tripsina	en gel 6% amb urea	30°C	20h	2µg	0	0%	0
SpeedVac	Tripsina	en gel 6% amb urea i b-mercaptoetanol	30°C	20h	2µg	0	0%	0
SpeedVac	Tripsina	en solució	30°C	20h	2µg	1	2%	0
SpeedVac	Quimotripsina	en gel 12%	30°C	20h	2µg	0	0%	0
SpeedVac	Quimotripsina	en gel 12%	30°C	20h	8µg	0	0%	0
SpeedVac	Quimotripsina	en gel 12%	30°C	20h	8µg	9	21%	47
SpeedVac	Quimotripsina	en gel 12%	30°C	4h	2µg	0	0%	0
SpeedVac	Quimotripsina	en gel 12%	30°C	4h	8µg	0	0%	0
SpeedVac	Quimotripsina	en gel 6%	30°C	20h	2µg	0	0%	0
SpeedVac	Quimotripsina	en gel 6%	30°C	20h	8µg	0	0%	0
SpeedVac	Quimotripsina	en gel 6%	30°C	20h	8µg	0	0%	0
SpeedVac	Quimotripsina	en gel 6%	30°C	20h	8µg	6	15%	0
SpeedVac	Quimotripsina	en gel 6%	30°C	4h	2µg	0	0%	0
SpeedVac	Quimotripsina	en gel 6%	30°C	4h	8µg	0	0%	0
SpeedVac	Quimotripsina	en gel 6% amb urea	30°C	20h	2µg	0	0%	0
SpeedVac	Quimotripsina	en gel 6% amb urea i b-mercaptoetanol	30°C	20h	2µg	0	0%	0
SpeedVac	Quimotripsina	en solució	30°C	2h	2µg	7	21%	0
SpeedVac	Quimotripsina	en solució	30°C	4h	2µg	0	0%	0
SpeedVac i precipitat	Tripsina	en gel 10%	30°C	20h	2µg	0	0%	0
SpeedVac i precipitat	Tripsina	en solució	37°C	6h	10µg	3	9%	0
SpeedVac i precipitat	Tripsina	en solució	37°C	20h	10µg	6	13%	0
SpeedVac i precipitat	Tripsina	en solució + 40%ACN	37°C	20h	10µg	0	0%	0
SpeedVac i precipitat	Quimotripsina	en solució	37°C	6h	10µg	1	2%	0
SpeedVac	Quimotripsina	en solució	30°C	20h	2µg	0	0%	0

SpeedVac i precipitat	Quimotripsina	en solució	37°C	20h	10µg	0	0%	0
SpeedVac i precipitat	Quimotripsina	en solució + 40%ACN	37°C	20h	10µg	0	0%	0
centricon	Tripsina	en gel 10%	30°C	20h	2,5µg	3	9%	0
centricon	Tripsina + BrCN	en solució	37°C	20h	13µg	0	0%	0
centricon	Tripsina	en solució	37°C	2h	13µg	0	0%	0
centricon	Tripsina	en solució	37°C	20h	13µg	0	0%	0
centricon	Quimotripsina	en gel 10%	30°C	20h	2,5µg	0	0%	0
centricon	Quimotripsina	en solució	37°C	20h	13µg	0	0%	0
diluit	Tripsina	en gel 10%	37°C	2h	0,5µg	3	11%	0
diluit	Tripsina	en gel 10%	30°C	20h	0,5µg	3	6%	0
diluit	Tripsina + BrCN	en solució	37°C	20h	2µg	1	5%	0
diluit	Tripsina	en solució	37°C	2h	2µg	0	0%	0
diluit	Tripsina	en solució	37°C	20h	2µg	4	13%	0
diluit	Quimotripsina	en gel 10%	37°C	2h	0,5µg	2	5%	0
diluit	Quimotripsina	en gel 10%	37°C	20h	0,5µg	0	0%	0
diluit	Quimotripsina	en solució	37°C	20h	2µg	0	0%	0
precipitat	Tripsina + BrCN	en solució	37°C	20h	13µg	0	0%	0
precipitat	Tripsina	en solució	37°C	2h	13µg	0	0%	0
precipitat	Tripsina	en solució	37°C	20h	13µg	3	12%	0
precipitat	Quimotripsina	en solució	37°C	20h	13µg	2	6%	0

Taula 1.4. Resultats obtinguts amb els experiments proteòmics sobre hµOR-Myc-His. A cada experiment s'indica el mètode de concentració emprat abans de la digestió, l'enzim utilitzat, el mode com s'ha dut a terme, la temperatura i el temps de la digestió, la quantitat de proteïna utilitzada, els fragments assignats a la seqüència, la cobertura que aquests representen i la puntuació obtinguda en la cerca per MASCOT per la proteïna correcta.

<u>10</u>	<u>20</u>	<u>30</u>	<u>40</u>	<u>50</u>	<u>60</u>
MDSSAAPTNA	SNCTDALAYS	SCSPAPSPGS	WVNLSHLDGN	LSDPCGPNRT	DLGGRDSLCP
<u>70</u>	<u>80</u>	<u>90</u>	<u>100</u>	<u>110</u>	<u>120</u>
PTGSPSMITA	ITIMALYSIV	CVVGLFGNFL	VMYVIVRYTK	MKTATNIYIF	NLALADALAT
<u>130</u>	<u>140</u>	<u>150</u>	<u>160</u>	<u>170</u>	<u>180</u>
STLPFQSVNY	LMGTWPFGTI	LCKIVISIDY	YNMFTSIFTL	CTMSVDRYIA	VCHPVKALDF
<u>190</u>	<u>200</u>	<u>210</u>	<u>220</u>	<u>230</u>	<u>240</u>
RTPRNAKIIN	VCNWILSSAI	GLPVMFMATT	KYRQGSIDCT	LTFSHPTWYW	ENLLKICVFI
<u>250</u>	<u>260</u>	<u>270</u>	<u>280</u>	<u>290</u>	<u>300</u>
FAFIMPVLII	TVCYGLMILR	LKSVRMLSGS	KEKDRNLRI	TRMVLVVAV	FIVCWTPIHI
<u>310</u>	<u>320</u>	<u>330</u>	<u>340</u>	<u>350</u>	<u>360</u>
YVIIKALVTI	PETTFQTVSW	HFICIALGYTN	SCLNPVLYAF	LDENFKRCFR	EFCIPTSSNI
<u>370</u>	<u>380</u>	<u>390</u>	<u>400</u>	<u>410</u>	<u>420</u>
EQQNSTRIRQ	NTRDHPSTAN	TVDRTNHQLE	NLEAETAPLP	LEQKLISEED	LNSAVDGGGH
HHHHHLARF					

Figura 1.22. Seqüència del receptor hμOR-Myc-His amb tots els fragments assignats durant els diferents experiments marcats. El taronja correspon als fragments de digestió trípica, el blau als fragments de digestió quimotríptica i el vermell al a superposició d'ambdós tipus de fragments. Les zones subratllades corresponen als tags afegits al receptor.

Encara que ajuntant tots els resultats es va obtenir una cobertura de seqüència que millorava les aconseguides a la literatura, on la màxima aconseguida pel RO era d'un 37%,^[61b] els resultats ja van fer preveure alguns problemes de cara als experiments de iodació. El primer va ser la baixa sensibilitat en els espectres aconseguits, el segon va consistir en la manca reproduïbilitat de resultats entre experiments molt similars, fins i tot en algunes repeticions d'experiments amb resultats positius i, el

més important, la baixa cobertura en els dominis transmembranals amb només 5 Tyr detectades en alguna digestió.

1.4.3.3. Intents de iodació del receptor opioide

Malgrat els possibles inconvenients, es van realitzar diverses proves de iodació sobre cèl·lules senceres ancorades a plaques de Petri, afegint el reactiu de iodació dissolt en DMSO al medi aquós. Es va seguir el procediment habitual de lisi i separació de la fracció de membranes per analitzar els homogenats per Western Blot. Aquests assajos, no van conduir a un material analitzable mitjançant tècniques proteòmiques per problemes durant la purificació del receptor modificat. Aquest sembla que no es pot purificar per immunoprecipitació ja que, després de la iodació, els anticossos no detecten per Western Blot els *tags* de Myc o T7 incorporats a la seqüència del receptor.

També es va realitzar un únic assaig de iodació sobre el receptor aïllat seguint el mateix protocol aplicat anteriorment a proteïnes model, se'n van realitzar sengles digestions en solució del cru de reacció amb tripsina i amb quimotripsina i es van analitzar per MALDI-TOF. Dels pics obtinguts, cap es va poder assignar a fragments de la seqüència del receptor ni a modificacions per iodació d'aquests.

1.5. Conclusions

- S'han emprat tècniques bioquímiques per posar a punt una metodologia d'anàlisi proteòmic de proteïnes de dimensions considerables o de membrana.
- S'han aplicat metodologies desenvolupades al grup per la modificació post-traduccionals per iodació de proteïnes patró, en concret: BSA, lisozim C i quimotripsinògen A.
- S'han analitzat aquestes proteïnes model segons els mètodes proteòmics optimitzats, discernint correctament les posicions modificades.
- S'ha aconseguit obtenir a partir de cultius cel·lulars suficient quantitat de receptor opioide per dur-hi a terme les tècniques desenvolupades.
- S'ha fet una primera exploració de l'aplicabilitat dels mètodes optimitzats a l'anàlisi del RO amb una cobertura de seqüència que millora les descrites a la literatura.

Capítol 2.

Estudis SAR de lligands del receptor opioide

2.1. Introducció

2.1.1. Lligands endògens del receptor opioide

Als anys 70, amb la descoberta dels receptors opioïdes, la recerca de molècules endògenes que activessin els receptors va prendre una gran empena davant la possibilitat de que aquestes no tinguessin els efectes secundaris de la morfina.^[63] Així fou com Hughes i Kosterlitz amb l'ajut de noves tecnologies com l'HPLC i l'espectrometria de masses aplicada a molècules biològiques van descobrir les encefalines, els primers lligands opioïdes endògens, aïllant-les d'homogenats de cervell de porc.^[64]

El descobriment de les encefalines aviat va ser seguit pel de la dinorfina A^[65] i la β -endorfina^[66]. Malgrat aquests tres opioïdes endògens comparteixen les quatre primeres posicions en la seva seqüència, presenten diferent selectivitat per un o altre receptor. Mentre que les encefalines tenen més afinitat per receptor delta,^[19] la dinorfina A té afinitat pel receptor kappa^[67] que havia proposat Martin^[18]. Tanmateix, la β -endorfina té alta afinitat per a dos dels receptors, els μ i delta. Cadascun d'aquests tres pèptids opioïdes es genera mitjançant el processament d'un precursor diferent, el que confirma que es tracta de famílies de pèptids separades.^[68] Al llarg dels anys, s'han descobert nous pèptids analgèsics com les endomorfines^[69] amb una gran afinitat pel receptor μ o les nociceptines^[70] amb afinitat pel receptor NOP o ORL1.

Nom	Fòrmula	Receptor opioide
Leu-enkefalina	H-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-OH	Delta
Met-enkefalina	H-Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-OH	Delta
Dinorfina A	H-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Arg-Ile-Arg-Pro-Lys-Leu-Lys-OH	Kappa
β-endorfina	H-Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-Thr-Ser-Glu-Lys-Ser-Gln-Thr-Pro-Leu-Val-Thr-Leu-Phe-Lys-Asn-Ala-Ile-Ile-Lys-Asn-Ala-Tyr-Lys-Lys-Gly-Glu-OH	Mu, delta
Endomorfina-1	H-Tyr-Pro-Trp-Phe-NH ₂	Mu
Nociceptina	H-Phe-Gly-Gly-Phe-Thr-Gly-Ala-Arg-Lys-Ser-Ala-Arg-Lys-Leu-Ala-Asn-Gln-OH	ORL-1

Taula 2.1. Seqüències de diferents neuropèptids opioïdes endògens amb indicació del receptor pel qual presenten major afinitat.

El descobriment de les encefalines i unes quantes dotzenes més de pèptids opioïdes endògens va produir ben aviat un gran interès en la indústria farmacèutica pel potencial terapèutic d'aquests pèptids com analgèsics. Aquest entusiasme inicial es va esvaïr ràpidament davant el fet que els pèptids opioïdes endògens difícilment penetren la barrera hematoencefàlica (BHE) i tenen una vida mitjana molt curta en plasma.^[71] Malgrat aquests inconvenients, l'esforç acadèmic i industrial en aquest camp, propiciat per factors com ara la facilitat i l'automatització de la síntesi de pèptids, ha produït extensos estudis SAR que han donat lloc a agonistes i antagonistes opioïdes molt potents i selectius.^[72] Alguns d'aquests pèptids mostren fins i tot un gran augment en la vida mitjana en sèrum, però, la penetració de la BHE encara segueix sent enigmàtica. Malauradament, cap d'aquests anàlegs ha arribat a la pràctica clínica.

El nostre grup de recerca, des de pràcticament el descobriment de les encefalines, ha tingut interès en els estudis SAR dels pèptids opioïdes.

La conjugació d'aquests pèptids amb carbohidrats simples, generalment monosacàrids, ha sigut una de les modificacions més estudiades. També més recentment hem estudiat l'efecte que l'halogenació de les cadenes aromàtiques laterals d'aquests pèptids té en la seva activitat. Aquest treball de tesi és una contribució a aquestes dues activitats del nostre grup de recerca.

2.1.2. Anàlegs glicosilats d'encefalines

En línia a l'evidència experimental de que la conjugació de certs neuropèptids amb carbohidrats simples millora les seves propietats farmacocinètiques,^[73] un dels resultats més importants del nostre grup de recerca va ser que la introducció dels monosacàrids β -glucosa (Glc) o β -galactosa (Gal) a la posició 5 del pèptid analgèsic optimitzat per Bajusz, anàleg de les encefalines [D-Met²,Pro⁵]encefalinamida (H-Tyr-D-Met-Gly-Phe-Pro-NH₂),^[72a] augmentava la seva potència analgèsica en models animals de dolor, fins a un nivells rècord.^[74] El derivat de Gal superava al de Glc de manera molt significativa, unes 57.000 vegades. A més, en altres projectes més recents també s'ha obtingut un increment en les propietats antinociceptives incorporant diferents monosacàrids, entre ells mannanosa (Man) a la morfina.^[75] Per altre banda, un dels pocs pèptids glicosilats que s'ha arribat a assajar amb primats és el glicopèptid que conté lactosa anomenat MMP-2200 [H₂N-Tyr-D-Thr-Gly-Phe-Leu-Ser-(O- β -D-lactose)-CONH₂].^[73c, 76]

Aquests augments de potència podrien estar correlacionats amb noves interaccions al centre actiu, així com amb canvis conformacionals a l'estructura peptídica produïts per la part sacarídica o podrien correspondre simplement a millores farmacocinètiques que permetin un millor pas a través de la BHE.^[77] Per tal de corroborar o descartar que

els efectes sobre l'activitat biològica de la part sacarídica d'aquests pèptids es deu a una millor interacció amb els RO, s'han sintetitzat aquests i altres nous anàlegs glicosilats del pèptid de Bajusz i s'han avaluat les seves constants d'afinitat amb els receptor μ i δ obtinguts de forma recombinant. Aquests estudis no foren possibles en el seu moment doncs encara no s'havien clonat els RO. A més a més, ara també s'ha volgut estudiar si aquests efectes corresponen a canvis conformacionals induïts per la part sacarídica.

2.1.3. Enllaç d'halogen

L'halogenació s'ha emprat tradicionalment en la química mèdica com un mitjà per regular la potència i les propietats farmacocinètiques dels fàrmacs. Un fet significatiu és que pràcticament la meitat de les noves molècules que avui es seleccionen per estudis de cribatge per trobar nous candidats a fàrmacs són halogenades.^[78]

Normalment, la introducció d'un àtom de gran volum en un lligand que ja encaixa correctament al seu centre actiu provoca una caiguda de l'afinitat per culpa d'impediments estèrics. En alguns casos, la introducció d'halògens cada cop més grans, seguint la sèrie F/H/Cl/Br/I, en lloc de disminuir-ne l'activitat, la millora gràcies a noves interaccions realitzades per aquests halogens.^[79] Aquestes interaccions electrostàtiques entre un halogen i un acceptor s'anomenen enllaços d'halogen (*halogen bonding*).^[80]

Aquest enllaç no covalent es dona freqüentment de forma natural en sistemes biològics.^[81] La interacció es produeix quan un àtom d'halogen del lligand forma contactes directes propers del tipus $R-X \cdots Z-R'$, on l'halogen X es comporta com a àcid de Lewis i Z pot ser qualsevol grup donant d'electrons a la proteïna diana, per exemple un grup carbonil de

l'esquelet proteic, que es trobi formant un angle i a una distància adequats per produir la interacció.^[82] L'enllaç d'halogen es forma per la inducció del forat- σ , que és una petita zona amb potencial electrostàtic positiu a la part posterior de la superfície de l'halogen seguint l'eix R-X causada per l'anisotropia de la densitat electrònica que l'envolta.^[83] Aquest efecte no es detecta en el cas de fluor, doncs la seva elevada electronegativitat neutralitza el forat- σ (σ -hole).^[84]

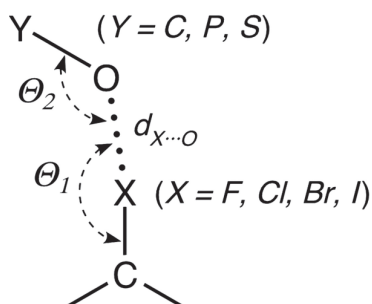


Figura 2.1. Esquema d'interaccions d'halogen (X) a diversos grups funcionals que contenen oxigen (on OY pot ser un carbonil, hidroxil o carboxilat quan Y és un àtom de carboni; un fosfat quan Y és un fòsfor; o un sulfat quan Y és un sofre). Figura extreta de: Auffinger P et al. PNAS 2004;101:16789-16794.

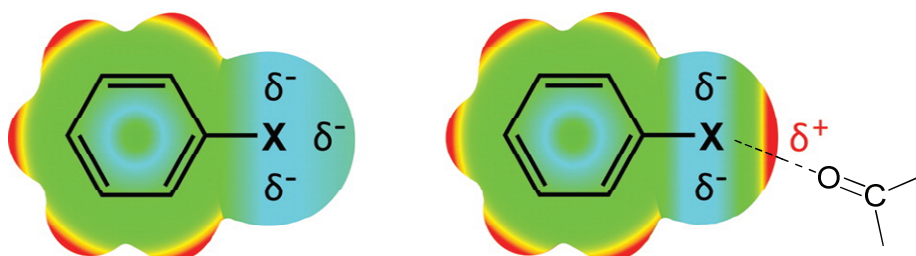


Figura 2.2. Esquema general de la distribució de càrrega electrostàtica en compostos orgànics. El degradat de blau cel a vermell representa superfícies de isodensitat electrònica de major, més negativa, a menor, més positiva. A l'esquerra l'assumpció clàssica que considerava els halògens coma bases de Lewis amb una distribució electrònica isotròpica. A la dreta, la distribució real destacant l'anisotropia de la densitat electrònica en l'halogen, incloent el forat σ de càrrega positiva a l'extrem i la possible interacció amb un donador d'electrons. Imatge extreta de l'article de Wilcken *et al.*^[79b]

En el cas dels pèptids opioïdes es coneixen alguns casos en que l'activitat està modulada per la introducció d'àtoms d'halogen. Així, per exemple els derivats clorats de [D-Pen², D-Pen⁵]encefalina (DPDPE) i dels seus anàlegs,^[85] produeix millores en la lipofilia i, per tant, en la permeabilitat cel·lular en estudis tant *in vitro* com *in vivo*. També, en altres estudis, com el realitzat a tetrapèptids derivats d'encefalines, la introducció d'halògens (clor i fluor) al residu de Phe⁴ van resultar en un increment de l'afinitat pels receptors.^[86] En cap cas, ni aquests ni altres precedents de pèptids opioïdes halogenats inclouen un estudi en el que s'hagi identificat o postular el paper dels àtoms d'halogen com a característic de l'enllaç d'halogen. En aquest treball de tesi hem explorat la possibilitat d'identificar enllaços d'halogen entre pèptids opioïdes halogenats i els seus receptors.

2.2. Objectius

Amb l'objectiu general de contribuir, entendre i racionalitzar estudis SAR de pèptids opioïdes que impliquin glicosidacions d'aminoàcids hidroxilats o halogenacions de cadenes laterals aromàtiques, els objectius concrets en aquesta part van consistir en:

- L'estudi de l'efecte de la glicosilació amb diferents carbohidrats en pèptids optimitzats.
- L'estudi de la introducció d'halògens en lligands naturals del receptor.
- Els estudis de relació estructura-activitat a partir de les dades obtingudes.

2.3. Tècniques emprades

2.3.1. Síntesi de pèptids

Els pèptids d'aquesta tesi s'han preparat per mètodes de síntesi manual de pèptids en fase sòlida seguint el protocol Fmoc. Aquests procediments són els més emprats i es troben àmpliament descrits a la literatura. Bàsicament consisteixen en realitzar cicles de desprotecció i acoblament de cada aminoàcid protegit ortogonalment fins a completar la seqüència.

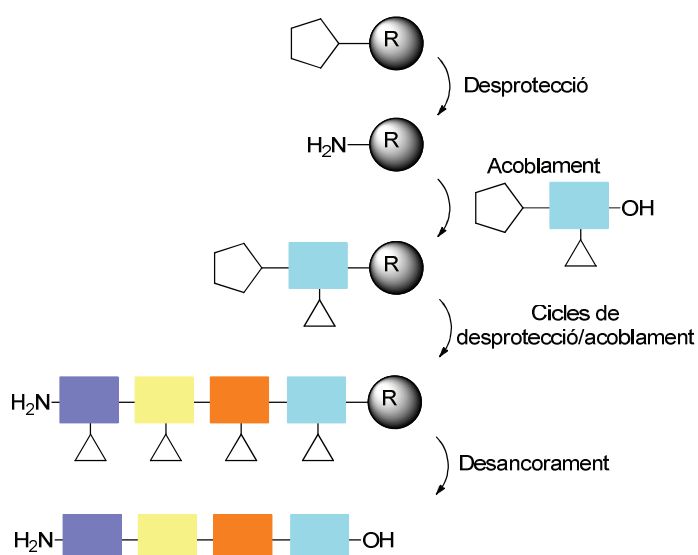


Figura 2.3. Diagrama del procediment de síntesi en fase sòlida.

Com a *building blocks*, s'empren els aminoàcids protegits a l'extrem *N*-terminal amb un el grup fluorenilmetoxycarbonil (Fmoc). Com agent d'acoblament habitual es fa servir emprat la *N,N'*-diisopropilcarbodiimida (DIC) i l'additiu hidroxibenzotriazol (HOBt).^[87] En els casos en que l'acoblament pot presentar dificultats, com per exemple quan es realitza sobre amines secundàries com la prolina o aminoàcids *N*-substituïts, es va emprar el reactiu hexafluorofosfat de benzotriazoliloxi-

tris[pirrolidino]fosfoni (PyBOP) i HOBt.^[88] L'eficiència dels acoblaments es va comprovar amb el test de Kaiser sobre petites alíquotes de resina.^[89]

Un cop finalitzada la síntesi, cada pèptid es va desancorar i, posteriorment, dessalar i purificar per columna preparativa en fase reversa amb un sistema *Versaflash*TM. Se'n va determinar la puresa per RP-HPLC i es van caracteritzar per espectrometria de masses UPLC-HRMS(ESI/TOF) per a la determinació de masses exactes.

2.3.2. Síntesi d'aminoàcids glicosilats (*building blocks*)

Per la síntesi química de *O*-glicopèptids, l'estratègia d'incorporar el carbohidrat als pèptids prèviament formats, síntesi convergent,^[90] està avui dia pràcticament descartada. L'alternativa consisteix en sintetitzar *building blocks* que siguin aminoàcids ja glicosilats, i protegits que permetin el seu ús en la síntesi en fase sòlida.

Apart dels *building blocks* glicosilats dels que ja disposàvem en el laboratori, en aquesta tesi se n'han sintetitzat alguns emprant el procediment descrit a la literatura.^[91] En aquest mètode, la glicosilació consisteix en fer reaccionar el donador de glicosil, que en aquest cas és un carbohidrat totalment protegit, acetilat o benzoïlat, amb un acceptor, que en aquest cas és un aminoàcid que conté un alcohol amb l'extrem *N*-terminal protegit amb Fmoc i l'extrem *C*-terminal lliure. La reacció es realitza en presència de l'àcid de Lewis trifluorur de bor eterat.^[25a]

Com que el grup en posició 2 del carbohidrat és un grup participant, en aquest cas el grup acetil, s'obtenen de forma estereoselectiva els glicòsids β per la Glc i la Gal i el glicòsid α per la Man.^[92]

Posteriorment a la síntesi i desancorament dels glicopèptids, va ser necessari aplicar una etapa de desprotecció específica dels èsters emprats com a grups protectors del carbohidrat. Aquesta es va realitzar en metanol anhidre emprant metòxid sòdic, seguint la reacció de Zemplén,^[93] de manera prèvia al procés de dessalat i purificació del glicopèptid.

2.4. Resultats i discussió

Com a qualsevol treball de química mèdica aquesta tesi inclou col·laboracions multidisciplinars amb altres grups de recerca essent la contribució de la doctorand, en aquest capítol, la corresponent al disseny i síntesis dels pèptids. Tots els pèptids han estat assajats biològicament per les Dres. Raquel E. Rodríguez i Verónica González Núñez al Instituto de Neurociencias de Castilla y León (INCyL) de la Universitat de Salamanca. També, el grup del Dr. Jesús Jiménez Barbero del Centre de Recerca Biològica (CIB-CSIC) de Madrid ha dut a terme els experiments per determinar la conformació en solució dels glicopèptids per mètodes de RMN. Igualment, hem comptat amb la col·laboració dels Drs. Leonardo Pardo i Giuanluigi Caltabiano de la Unitat de Bioestadística de la Facultat de Medicina de la Universitat Autònoma de Barcelona (UAB) pels estudis de modelització molecular de les possibles interaccions produïdes per enllaç d'halogen entre els pèptids i els receptors opioïdes.

2.4.1. Anàlegs glicosilats de [D-Met²,Pro⁵]encefalinamida

Per tal d'estudiar l'efecte que la glicosilació exerceix sobre l'afinitat pels RO del pèptid [D-Met²,Pro⁵]encefalinamida es van resintetitzar els seus anàlegs amb glucosa (Glc) i galactosa (Gal). També, donat que en el nostre laboratori s'ha trobat que un mannòsid de morfina en millora les propietats biològiques, es va preparar l'anàleg del pèptid amb manosa (Man). S'ha volgut estudiar també l'efecte de disacàrids, doncs un dels pocs pèptids glicosilats que ha arribat a assajos amb primats és un anàleg de lactosa.^[73c] Així s'han preparat els anàlegs corresponents amb els disacàrids lactosa (Lac: β -D-Gal-(1 \rightarrow 4)-D-Glc) i cel·lobiosa (Cel: β -D-Glc-(1 \rightarrow 4)-D-Glc).

2.4.1.1. Síntesi de building blocks glicosilats

Per obtenir els pèptids indicats es van sintetitzar els glicosilaminoàcids de la figura 2.4 per emprar-los com a *building blocks*, seguint la reacció mostrada a l'apartat 2.3.2 amb rendiments entre el 30 i el 40%, ja que aquests no eren comercialment assequibles. La caracterització completa es va fer per RP-HPLC, UPLC-HRMS(ESI/TOF) i RMN emprant experiments de ^1H -NMR, ^{13}C -NMR, ^1H -COSY i ^1H - ^{13}C -HSQC.

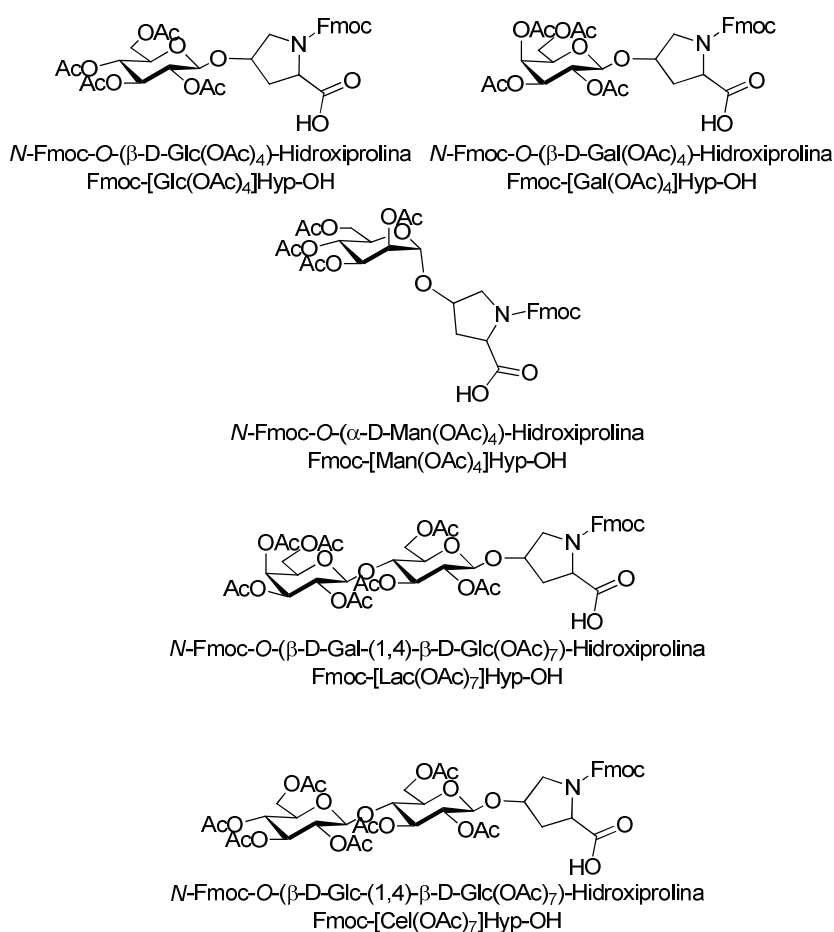


Figura 2.4. *Building blocks* sintetitzats.

Donat que els *building blocks* Fmoc-(Glc(OAc)₄)Hyp-OH i Fmoc-(Gal(OAc)₄)Hyp-OH es van obtenir en crus de difícil separació, es va decidir procedir a la síntesi de pèptids amb els *building blocks* corresponents benzoïlats, que es trobaven sintetitzats al grup de recerca. En el cas de Fmoc-(Man(OAc)₄)Hyp-OH, Fmoc-(Lac(OAc)₇)Hyp-OH i Fmoc-(Cel(OAc)₇)Hyp-OH es van obtenir un crusos més fàcilment purificables. Pels diglicòsids, inicialment es va provar la síntesi de pèptids amb els seus anàlegs benzoïlats, però per causa de la difícil desprotecció d'un número elevat de benzoïls, va resultar més eficient el treball amb els compostos acetilats.

2.4.1.2. Síntesi d'anàlegs de [D-Met²,Pro⁵]encefalinamida

El pèptid [D-Met²,Pro⁵]encefalinamida i els seus anàlegs glicosilats en prolina es van preparar per síntesi manual en fase sòlida utilitzant els protocols estàndards Fmoc (*videsupra*) a partir de *building blocks* comercials, sintetitzats anteriorment al grup o sintetitzats a l'apartat 2.4.1.1. Després de desacetilar i purificar per RP-MPLC, es va comprovar la puresa dels pèptids per RP-HPLC analítica i es van caracteritzar per masses exactes d'alta resolució.

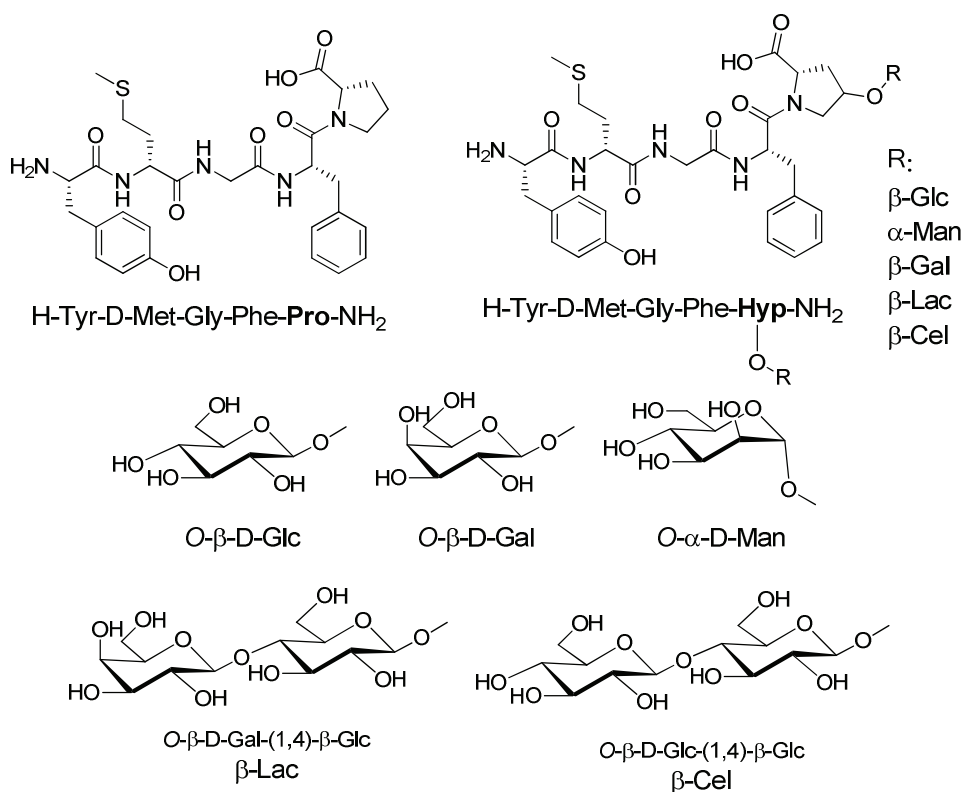


Figura 2.5. Esquema de l'estructura de la [D-Met²,Pro⁵]encephalinamida i de les glicoencefalines anàlogues sintetitzades.

2.4.1.3. Activitat dels compostos

L'afinitat pels RO dels compostos sintetitzats es va evaluar a l'INCyL. Els assajos es van realitzar per desplaçament de [³H]diprenorfina sobre homogenats de membrana de cèl·lules HEK-293, establint transfectades amb els receptors opioïdes μ, δ₁ i δ₂ de peix zebra (*Danio Rerio*),^[94] utilitzant diferents concentracions dels lligands per establir la constant d'afinitat (K_i). Els resultats obtinguts es resumeixen a la taula 2.2 i a la figura 2.6. Les dades es van comparar amb morfina i Met-enkefalina com a compostos de referència.

Pèptids	Ki (nM)		
	drMOR	drDOR1	drDOR2
[D-Met ² ,Pro ⁵]encefalinamida	269,0 ± 49,0	441,6 ± 126,1	256,4 ± 39,4
[D-Met ² ,(Glc)Hyp ⁵]encefalinamida	312,6 ± 67,6	389,5 ± 118,8	158,9 ± 18,9
[D-Met ² ,(Man)Hyp ⁵]encefalinamida	336,1 ± 99,0	608,6 ± 58,4	442,8 ± 93,4
[D-Met ² ,(Gal)Hyp ⁵]encefalinamida	383,3 ± 57,1	488,2 ± 105,0	402,6 ± 118,2
[D-Met ² ,(Lac)Hyp ⁵]encefalinamida	202,5 ± 3,7	829,8 ± 205,2	457,2 ± 102,3
[D-Met ² ,(Cel)Hyp ⁵]encefalinamida	223,1 ± 24,8	697,9 ± 160,0	424,0 ± 104,7
Morfina	202	223	1400
Met-encefalina	680	---	45

Taula 2.2. Afinitat *in vitro* de la família d'anàlegs glicosilats d'encefalinamida. L'afinitat respecte morfina i Met-encefalina s'empren com a referència dels valors.

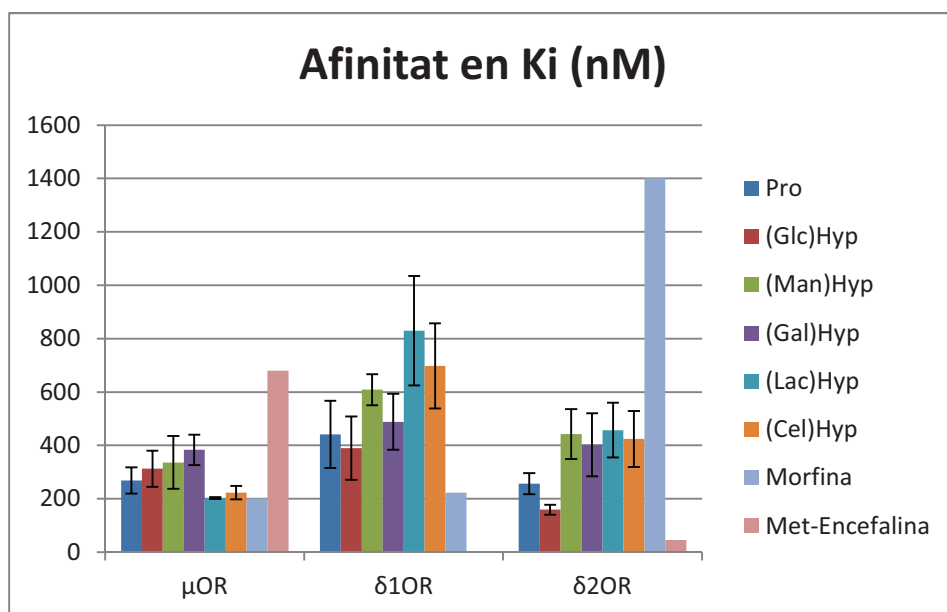


Figura 2.6. Afinitat *in vitro* dels lligands de la família d'anàlegs glicosilats d'encefalinamida. L'afinitat respecte morfina i Met-encefalina s'empren com a referència dels valors

A la vista dels resultats es pot concloure que no hi ha diferències d'afinitat estadísticament significatives entre els productes de la sèrie, doncs tots els valors d'afinitat dels glicopèptids, així com els del compost patró, es van trobar dins els mateix ordre de magnitud per tots tres receptors així com també respecte els compostos de referència morfina i Met-enkefalina. Tanmateix, respecte al pèptid patró, s'observa un lleuger empitjorament de l'afinitat dels compostos pel fet d'estar glicosilats. Aquestes petites diferències d'afinitat suggereixen que la part sacarídica no juga un paper important en la unió entre receptor i lligand.

2.4.1.4. Anàlisi conformacional en solució

Per tal d'estudiar si les diferències d'activitat observades *in vivo* podien ser atribuïbles a canvis conformacionals del pèptid induïts per la part sacarídica, es van realitzar nous estudis de conformació en solució amb tècniques més modernes de RMN que les emprades en els estudis inicials ara fa quasi 25 anys.^[95] Aquests nous experiments inclouen l'anàlisi dels nous glicopèptids així com experiments en models de membrana cel·lular (micel·les de SDS)^[96]. Els experiments de RMN els va realitzar el grup del Dr. Jesús Jiménez Barbero^[75] al CIB-CSIC de Madrid, i varen consistir en experiments estàndard de 2D-TOCSY amb diferents temps de mescla (20 i 60 ms) que es van complementar amb experiments 2D-ROESY (200 ms) i 2D-NOESY (300 ms).

En els resultats obtinguts, no van aparèixer diferències significatives entre els espectres NOE en un o altre medi, amb l'excepció de canvis d'intensitat dels pics i del seu apantallament, habituals en ambients micel·lars. Aquesta informació indicaria que la conformació adoptada per aquests pèptids en entorns de membrana corresponen a la mateixa conformació principal existent en solució aquosa.

L'anàlisi acurat de les dades espectroscòpiques tampoc va revelar cap diferència conformacional important entre el compost original i els seus anàlegs glicosilats. Només es van observar petites diferències en els desplaçaments dels grups NH, tanmateix, aquests canvis no es van considerar estructuralment rellevants ja que aquests protons presenten una gran sensibilitat a pertorbacions de pH. En resum, no es va observar que cap d'ells presentés una conformació característica pròpia ni que la part sacarídica establís interaccions fortes amb la cadena peptídica. A partir d'aquestes dades, amb el software Macromodel 9.6 es van realitzar dissenys *in silico* de la conformació majoritària en solució pels compostos. Les estructures proposades van explicar la majoria dels contactes NOE observats experimentalment, tot i que aquesta conformació podria estar en equilibri puntual amb altres conformacions per poder assignar tots els senyals, fet molt freqüent en aquest tipus de compostos.

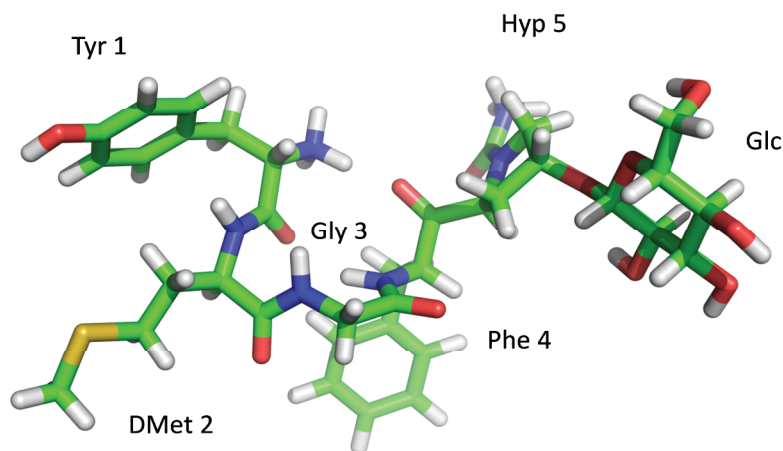


Figura 2.7: Conformació majoritària en solució de [D-Met², (Glc)Hyp⁵]encefalinamida

Aquests resultats suggereixen finalment que els efectes remarcables de potenciació d'activitat trobats *in vivo* es poden deure possiblement a

efectes farmacocinètics o metabòlics (ADME) i no a canvis estructurals o millores d'interacció amb el receptor opioide.

2.4.2. Enllaç d'halogen.

Per tal de comprovar experimentalment si una interacció de tipus enllaç d'halogen podria tenir lloc entre lligands i receptors opioides, modulant la seva activitat, es va proposar estudiar l'afinitat pels diferents receptor opioides de sèries homòlogues de derivats halogenats de lligands endògens agonistes del receptor.

2.4.2.1. Síntesi d'anàlegs halogenats

Els compostos patró escollits van ser els pèptids endomorfin-1 i Leu-encefalina, amb diferent grau d'afinitat pels receptors μ i δ . Els àtoms d'halogen es van introduir en el residu Phe⁴ present en ambdós compostos, posició que sembla tolerar bastantes modificacions sense perdre activitat. Es van preparar quatre pèptids homòlegs halogenats (F, Cl, Br, I) en la posició 4 (*para*-) del residu Phe⁴ de la endomorfin-1 i set pèptids més en homòlegs halogenats (F, Cl, Br, I) en posicions 2 (*orto*-) o 4 (*para*-) del residu Phe⁴ de la Leu-encefalina, a partir de *building blocks* comercials o sintetitzats prèviament al grup de recerca.

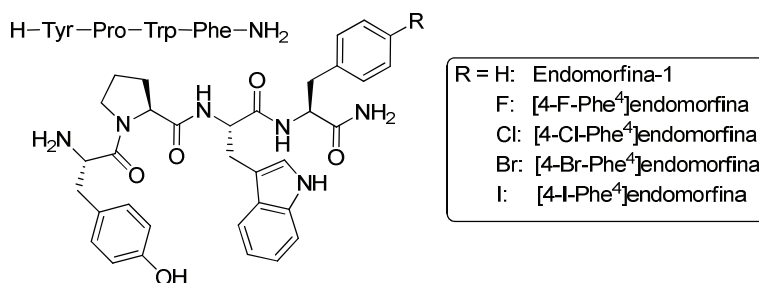


Figura 2.8. Esquema de la sèrie d'endomorfines halogenades sintetitzades.

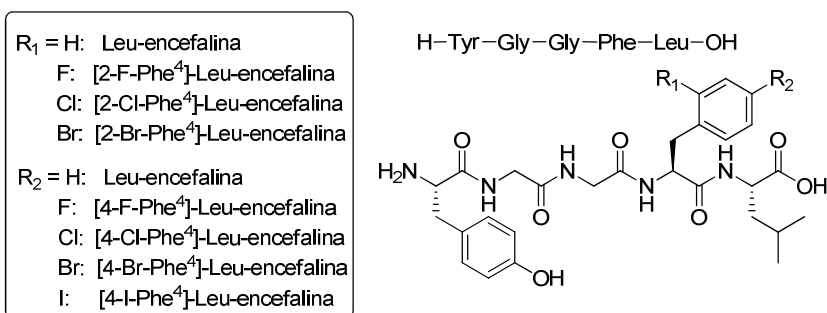


Figura 2.9. Esquema de les sèries de Leu-encefalines halogenades sintetitzades.

2.4.2.2. Test d'afinitat *in vitro* dels compostos

Com en el cas dels glicopèptids, les afinitats pels RO dels compostos sintetitzats van ser avaluades pel grup de la Dra. Raquel E. Rodríguez de l'INCyL a la Universitat de Salamanca. Els assajos es van realitzar per desplaçament de [³H]diprenorfina sobre homogenats de membrana de cèl·lules HEK-293 establint transfectades amb els receptors opioïdes μ , δ_1 i δ_2 de peix zebra (*Danio Rerio*) emprant diferents concentracions dels lligands per establir la constant d'afinitat (K_i).

2.4.2.3. Endomorfines halogenades en Phe⁴

A partir de les dades obtingudes als assajos, es va emprar el valor de K_i per analitzar la possible evidència d'enllaç d'halogen. Els compostos es van ordenar en taules i gràfiques seguint la sèrie F/H/Cl/Br/I per major claredat en l'anàlisi, ja que en cas d'enllaç d'halogen la constant d'afinitat hauria de millorar mostrant una disminució del seu valor.

Pèptids	Ki μ OR (nM)	Ki δ_1 OR (nM)	Ki δ_2 OR (nM)
[4-F-Phe ⁴]endomorfina	51	5326	4800
Endomorfina-1	32	8473	6205
[4-Cl-Phe ⁴]endomorfina	72	1701	2329
[4-Br-Phe ⁴]endomorfina	135	1901	2685
[4-I-Phe ⁴]endomorfina	294	1594	1965

Taula 2.3. Resultats dels assajos d'afinitat de la sèrie d'endomorfines sobre els receptor opioide μ , δ_1 i δ_2 .

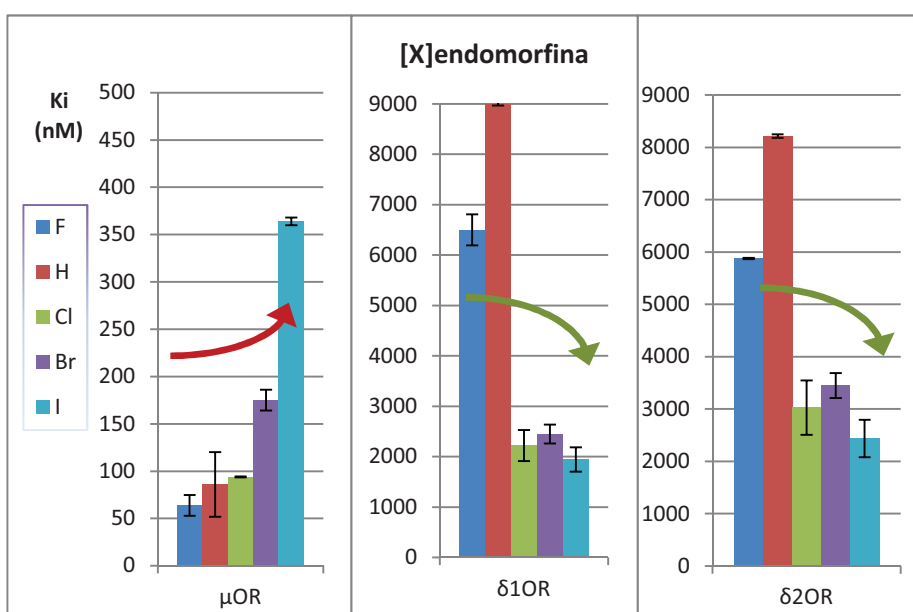


Figura 2.10. Resultats dels assajos d'afinitat de la sèrie d'endomorfines sobre els receptor opioide μ , δ_1 i δ_2 . Les fletxes indiquen la tendència de la Ki, en vermell si empitjora i en verd si millora.

Com s'observa a la taula 2.3 i a la figura 2.10, respecte el receptor opioide μ , l'endomorfina va seguir la relació $F < H \approx Cl < Br < I$. Així doncs, no només no va mostrar millores en la Ki, ans el contrari, va empitjorar amb el volum creixent de l'halogen. De manera que es va concloure que no s'establien enllaços d'halogen i que l'àtom d'halogen

induïa efectes estèrics negatius per l'afinitat. Respecte els receptors δ_1 i δ_2 , en canvi, si que es va observar la tendència desitjada $I < Cl \approx Br \ll F < H$, amb una lleugera disfunció entre Cl i Br, de manera que, en principi, es va poder raonar que la sèrie d'endomorfines halogenades poden establir enllaços d'halogen amb ambdós receptors δ .

2.4.2.4. *Leu encefalines halogenades en orto-Phe⁴*

Com a la sèrie anterior, a partir de les dades obtingudes als assajos, es va emprar el valor de K_i per analitzar els possibles casos d'enllaç d'halogen.

	Pèptids	K_i μ OR (nM)	K_i δ_1 OR (nM)	K_i δ_2 OR (nM)
	[2-F-Phe ⁴]Leu-encefalina	2228	115	91
	Leu-encefalina	1317	73,05	175,20
	[2-Cl-Phe ⁴]Leu-encefalina	754	43	57
	[2-Br-Phe ⁴]Leu-encefalina	1430	24	32

Taula 2.4. Resultats dels assajos d'afinitat de la sèrie de Leu-encefalines halogenades en *orto*-Phe⁴ sobre els receptor opioide μ , δ_1 i δ_2 .

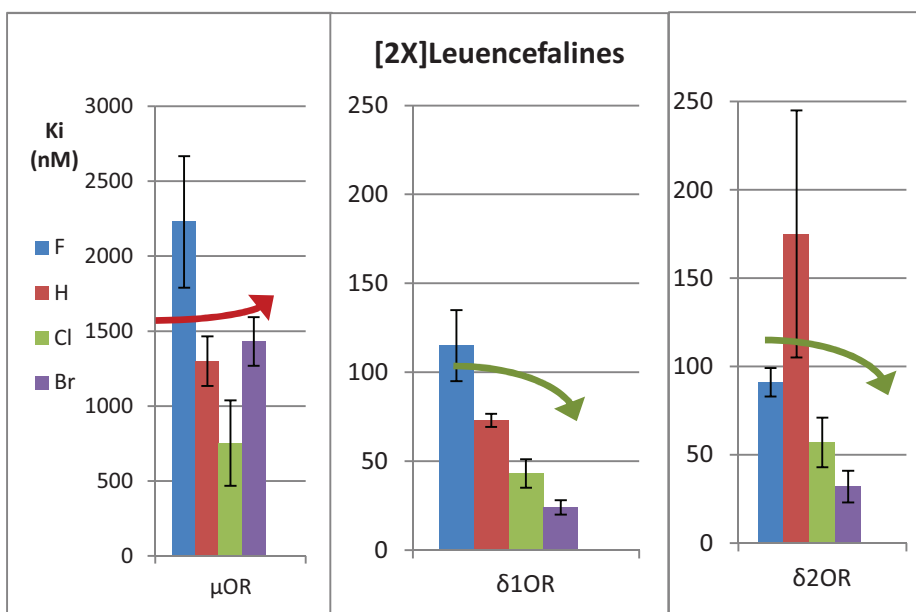


Figura 2.11. Resultats dels assajos d'afinitat de la sèrie de Leu-encefalines halogenades en *orto*-Phe⁴ sobre els receptors opioïdes μ , δ_1 i δ_2 . Les fletxes indiquen la tendència de la K_i , en vermell si empitjora i en verd si millora.

Malgrat que la sèrie es troba incompleta per la manca del corresponent anàleg iodat (en no trobar-se el corresponent *building block*), la tendència observada a la taula 2.4 i a la figura 2.11, seguint la relació $\text{Cl} < \text{H} \approx \text{Br} \ll \text{F}$ respecte el receptor opioïde μ va suggerir la manca d'enllaç d'halogen, amb un impediment estèric poc marcat. Respecte els receptors δ_1 i δ_2 , en canvi, si que es va observar una tendència: $\text{Br} < \text{Cl} < \text{H} \ll \text{F}$ i $\text{Br} < \text{Cl} \ll \text{F} \lll \text{H}$, indicativa de la interacció d'enllaç d'halogen.

2.4.2.5. Leu-encefalines halogenades en *para*-Phe⁴

També a la sèrie de Leu-encefalines halogenades en *para*-Phe⁴, a partir de les dades obtingudes als assajos, es va emprar el valor de Ki per analitzar els possibles casos d'enllaç d'halogen.

	Pèptids	Ki μ OR (nM)	Ki δ_1 OR (nM)	Ki δ_2 OR (nM)
	[4-F-Phe ⁴]Leu-encefalina	210	11	10
	Leu-encefalina	1317	73,05	175,20
	[4-Cl-Phe ⁴]Leu-encefalina	312	44	40
	[4-Br-Phe ⁴]Leu-encefalina	287	34	27
	[4-I-Phe ⁴]Leu-encefalina	540	44	53

Taula 2.5. Resultats dels assajos d'afinitat de la sèrie de Leu-encefalines halogenades en *para*-Phe⁴ sobre els receptors opioïdes μ , δ_1 i δ_2 .

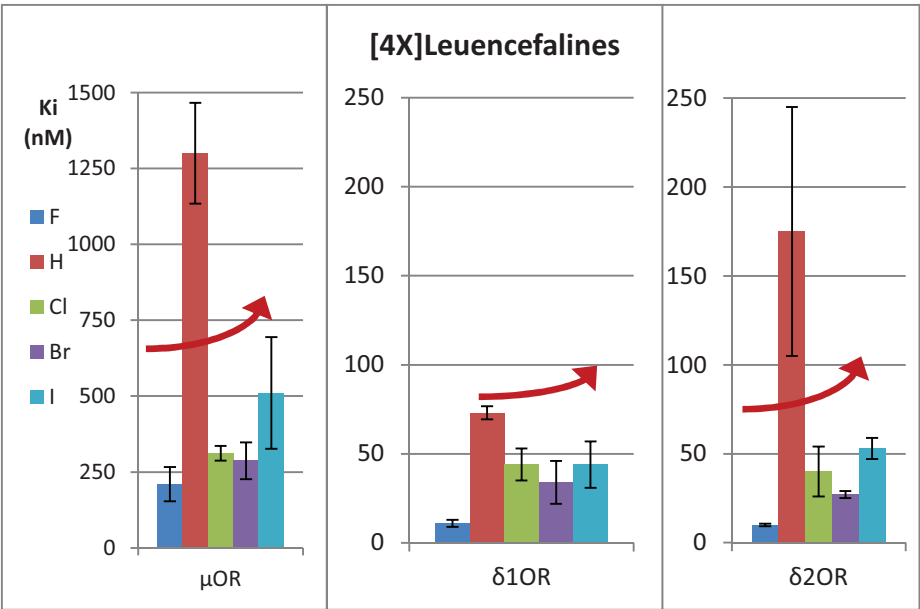


Figura 2.12. Resultats dels assajos d'afinitat de la sèrie de leu encefalines halogenades en *para*-Phe⁴ sobre els receptors opioïdes μ , δ_1 i δ_2 . Les fletxes indiquen la tendència de la Ki, en vermell si empitjora i en verd si millora.

Com s'observa a la taula 2.5 i a la figura 2.12, respecte els 3 receptors, la sèrie de compostos de Leu-encefalina halogenats en posició *para* van seguir la relació $F < Br < Cl < I < H$. Aquest augment progressiu de les constants d'afinitat amb la grandària de l'halogen va indicar clarament l'absència d'interaccions estabilitzants per enllaç d'halogen en aquesta posició, mentre que valors d'afinitat molt similars, dins de l'error experimental, com en el cas de les Ki al receptor δ_1 van indicar també l'absència d'impediments estèrics.

2.4.2.6. Modelització molecular de la interacció entre lligands halogenats i els RO

Per tal de racionalitzar els resultats biològics amb models computacionals, el grup del Dr. Leonardo Pardo de la Unitat de Bioestadística de la Facultat de Medicina de la Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), que ha participat en els recents treballs d'obtenció dels models cristal·logràfics dels RO,^[28] es va oferir a construir i proposar una hipòtesi computacional de la interacció que suggereixen els resultats d'afinitat d'aquestes famílies de lligands halogenats amb els RO.

Així, per discernir entre les conformacions de menor energia dels lligands que encaixen als canals i butxaques presents al centre actiu, els Drs. Leonardo Pardo i Gianluigi Caltabiano van fer servir dades aportades per la bibliografia sobre la selectivitat dels lligands pels tipus de receptors i van comprovar que les conformacions obtingudes concordin amb les nostres dades experimentals amb l'impediment estèric al voltant de les fenilalanines i la presència o absència d'una possible interacció d'enllaç d'halogen. Aquests models s'estan optimitzant mitjançant càlculs de mecànica quàntica i mecànica molecular (QM/MM).

El model construït va tenir en compte, per una banda, la interacció entre les Tyr *N*-terminals dels pèptids i els dominis transmembrana TM3 i TM6, concretament la interacció del fenol amb la Hys6.52 *via* dos molècules d'aigua i de l'amina terminal protonada amb l'Asp3.32. Aquesta interacció és equivalent a la que s'observa amb grups funcionals similars presents en els lligands no-peptídics que s'han utilitzat per obtenir les estructures cristal·logràfiques fins ara descrites pels RO.^[28-31] El model s'ajustaria també a les dades descrites a diferents estudis SAR de pèptids opioïdes on la Tyr *N*-terminal es considera essencial pel reconeixement del receptor mentre que l'extrem C-terminal dels pèptids en determinaria la selectivitat per un o altre receptor.^[67, 97] Per altra banda, es van emprar les dades de selectivitat pels RO μ i δ per discernir quines conformacions de les que es poden col·locar al centre actiu quedarien correlacionades amb les nostres dades experimentals d'afinitat.

En la conformació de l'endomorfina-1 que millor encaixa al μ OR, tal i com s'observa a la figura 2.13, a més d'aconseguir-se una interacció hidrofòbica entre el Trp³ i la Tyr2.64, l'anell de la Phe⁴ queda col·locat en una butxaca hidrofòbica entre la Val3.38 i el Trp127, mentre que l'amida C-terminal estableix un enllaç d'hidrogen amb els residus específics pel μ OR Asn2.63 i Asp213, així com també amb el residu conservat Gln2.60. A més, com s'observa a la figura 2.14, la incorporació d'un àtom d'halogen en posició *para*- de la Phe quedaria dirigit cap a la Thr2.56 i la Val3.28, on no hi ha gaire espai disponible i provocaria un impediment estèric, que seria responsable de la disminució d'afinitat per aquest receptor observada en aquesta família d'anàlegs halogenats. Per contra, en el cas del δ OR, l'absència dels dos residus específics per μ OR Asn2.63 i Asp213 i la manca d'aquesta

interacció semblen ser la causa de la baixa afinitat de l'endomorfina per aquest receptor.

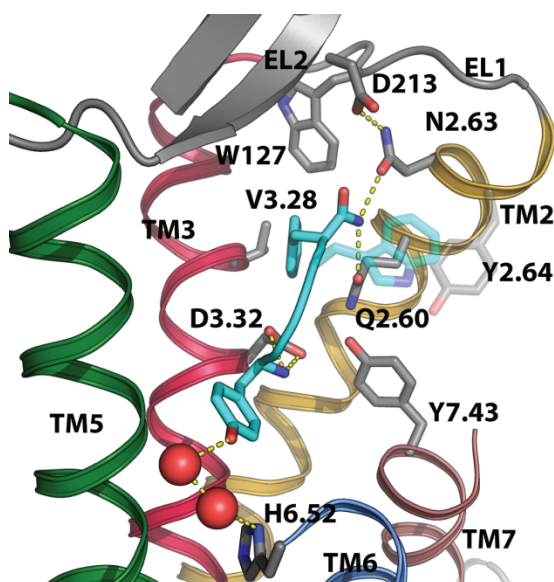


Figura 2.13. Representació gràfica de l'anàlisi computacional de les interaccions entre l'endomorfina-1 (H-Tyr-Pro-Trp-Phe-NH₂) i el μOR.

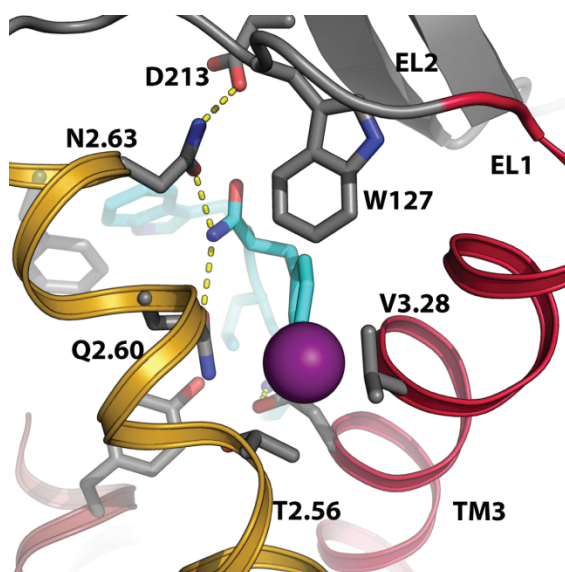


Figura 2.14. Ampliació del model a la zona on interacciona la Phe⁴ de l'endomorfina-1 amb el μOR. Es pot observar l'impediment estèric induït amb la introducció d'àtoms d'halogen a l'anell, aquí indicats en color violeta.

En el cas de la conformació de la Leu-encefalina, que encaixa millor amb el model del δ OR, es pot observar a la figura 2.15 com la Phe⁴ arriba a col·locar-se a la mateixa butxaca del centre actiu que la d'endomorfina-1, però en un angle totalment diferent i en posició perpendicular. A més, la Leu⁵ forma una interacció hidrofòbica amb el residu de Ile202, específic al δ OR, així com també amb la Lys2.63. Anàlogament al que ja em observat a l'anàlisi anterior, l'absència d'aquests dos residus en el μ OR sembla ser responsable de la selectivitat de la Leu-encefalina pel δ OR. Aquesta conformació es veuria corroborada a més, per la possible interacció entre els halògens incorporats en posició *orto*- de la Phe⁴ amb el carbonil de la Phe2.59, que es troben en un angle òptim (87°) i a una distància adequada (3,2 Å); així com també amb la impossibilitat d'establir aquesta interacció en posició *para*-.

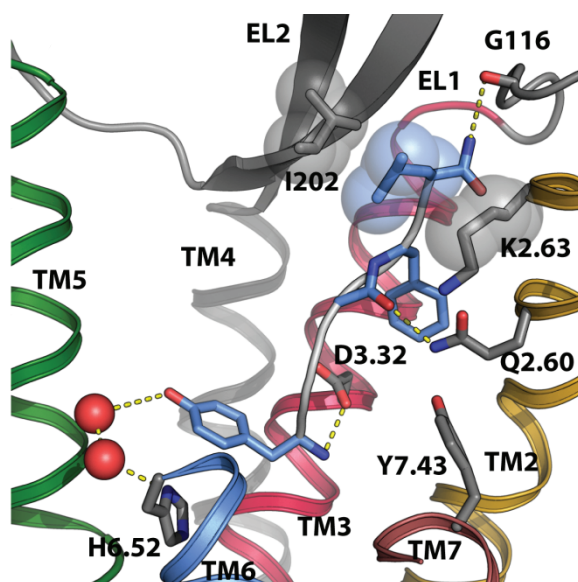


Figura 2.15. Representació gràfica de l'anàlisi computacional de les interaccions entre la Leu-encefalina (H-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu) i el δ OR.

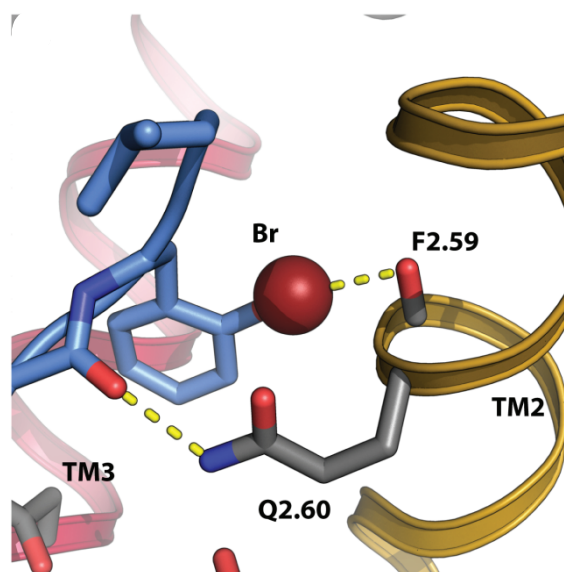


Figura 2.16. Ampliació del model a la zona on interacciona la Phe⁴ de la Leu-encefalina amb el δ OR. Es pot observar l'establiment de pont d'halogen entre un àtom de brom introduït en posició *orto*- de la Phe (indicat en vermell), i el carbonil de la Phe2.59.

El model finalment obtingut un cop refinat pels estudis en curs de QM/MM es podria emprar pel disseny racional de fàrmacs, de nous lligands dels RO o modificacions dels ja coneguts, que podrien ser candidats a fàrmacs analgèsics.

2.5. Conclusions

Dels estudis SAR en lligands endògens dels receptors opioïdes es va concloure:

- En l'estudi d'afinitat respecte els receptors μ , δ_1 i δ_2 del pèptid [D-Met²,Pro⁵]encefalinamida i els seus anàlegs glicosilats:
 - a. Tota la sèrie es va trobar dins del mateix ordre de magnitud, sense diferències significatives.
 - b. En el seu estudi corresponent de conformació en solució per NMR, no es van observar ni canvis conformacionals ni interaccions intenses entre la part del carbohidrat i la part peptídica.
 - c. Es va concloure que les diferències d'activitat *in vivo* descrites no es deuen a fenòmens farmadiconàemics.

- En l'estudi d'afinitat respecte els receptors μ , δ_1 i δ_2 de les famílies de pèptids halogenats [4-X-Phe⁴]endomorfina, [2-X-Phe⁴]Leu-encefalina i [4-X-Phe⁴]Leu-encefalina:
 - a. Les sèries [4-X-Phe⁴]endomorfina i [2-X-Phe⁴]Leu-encefalina van establir interaccions favorables d'enllaç d'halogen amb els receptors δ_1 i δ_2 .
 - b. Cap de les 3 sèries va establir enllaços d'halogen amb el receptor μ , així com tampoc ho va fer la sèrie [4-X-Phe⁴]Leu-encefalina per cap dels receptors, sigui per problemes d'impediment estèric o per manca d'interaccions amb l'halogen.
 - c. Els estudis computacionals en procés han localitzat conformacions que permeten explicar totes les dades obtingudes.

Capítol 3. Opiorfina

3.1. Introducció

En el camp del descobriment de nous compostos analgèsics, una de les possibilitats que es contemplen per trobar fàrmacs que en l'escala del dolor tinguin una activitat intermèdia entre els AINEs i els opioïdes és la de trobar compostos que interfereixin amb el metabolisme dels pèptids opioïdes endògens. En essència, es tracta d'inhibir la degradació natural d'aquests pèptids per part de les endopeptidases endògenes, de manera que es prolongui el seu temps d'acció.

3.1.2. Metabolisme de les Encefalines

En aquest context, la degradació enzimàtica de les encefalines ha sigut la més estudiada. El catabolisme de les encefalines està regulat per dos metal·lopeptidases, anomenades encefalinases, que es troben densament localitzades a les mateixes regions cerebrals on es troben els receptors opioïdes i on es generen les encefalines. Aquestes metal·lopeptidases són l'endopeptidasa neutra (també anomenada Neprilisina o NEP) i l'aminopeptidasa N (AP-N). Per una banda, la NEP hidrolitza una sèrie de neuropèptids, entre ells les encefalines, a l'extrem *N*-terminal d'aminoàcids hidrofòbics i i , per una altra, l'AP-N allibera els aminoàcids de l'extrem *N*-terminal dels pèptids amb glicines a la següent posició. Aquestes encefalinases hidrolitzen ràpidament les encefalines i, per tant, n'aturen l'efecte analgèsic.^[98]

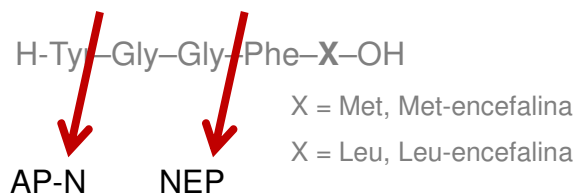


Figura 3.1. Punts de tall de les peptidases AP-N i NEP.

S_1 S_1' S_2'
 Zn
 $-N-CH(R_1)-C(=O)-NH-CH(R_1')-C(=O)-NH-CH(R_2')-C(=O)-$
 H H H
 H H H
 Substrat

3.1.3. Inhibitors d'encephalinases.

Malgrat les dificultats inherents a la manca d'informació d'estructural, les

estudiada,^[102] van ser el punt de partida pels primers dissenys d'inhibidors selectius, així com d'inhibidors duals entre NEP i altres enzims, com l'enzim convertidor d'angiotensina (ACE).^[103] El grup del professor Bernard Roques del CNRS de París va ser l'iniciador i ha sigut el que més ha contribuït al desenvolupament d'aquests inhibidors.^[102c, 104] Els inhibidors resultants d'aquests estudis són petites molècules amb una part quelant de l'àtom de Zn, com per exemple: hidroxamats, hidroxiacetones, carboxilats, fosforils o tiols; en un esquelet format per una estructura dipeptídica o peptidomimètica.

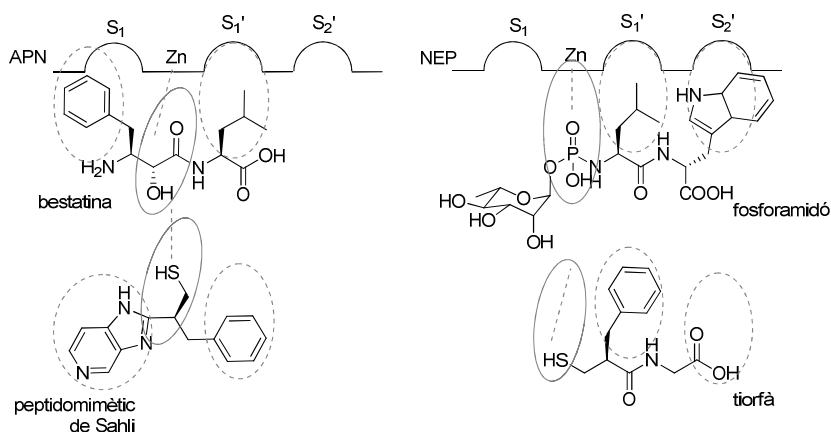


Figura 3.3. Representació esquemàtica d'inhibidors selectius per AP-N i NEP. Bestatina i fosforamidó són lligands naturals mentre que el peptidomimètic de Sahli i el tiorfà han estat dissenyats.

Un dels primers exemples de tals compostos va ser el tiorfà, un inhibidor selectiu de NEP que incorpora un tiol com a quelant i té estructura anàloga a un dipèptid.^[105] Ara bé, la dificultat en la formulació d'un inhibidor dual es va fer ben aviat evident davant la necessitat òbvia de trobar interaccions òptimes per a dues peptidases de zinc que, malgrat ésser funcionalment similars, mostren com s'ha esmentat, diferents especificitats. Un compost que va aconseguir aquest efecte és el kelatorfà, que integra un potent grup quelant hidroxamat, amb l'inconvenient que aquest elevat poder de quelació el fa inespecífic per a

qualsevol metal·loproteasa.^[106] Amb l'objectiu d'aconseguir inhibidors duals, aquesta inespecificitat s'ha intentat resoldre a base de molècules quimèriques com ara RB101, preparades per la unió d'un potent inhibidor d'AP-N amb un inhibidor de NEP per un enllaç disulfur. Aquesta molècula és un profàrmac, doncs és un compost inactiu que no es pot coordinar al Zn fins que es produeix la hidròlisi que allibera els grups tiols.^[104a, 107] Finalment, l'últim pas en aquest procés va ser el disseny de compostos veritablement duals, com ara RB3001, compost amb un grup aminofosfínic actiu per ambdues peptidases.^[108] Malauradament, cap d'aquests compostos ha arribat a fases clíniques pel tractament del dolor.

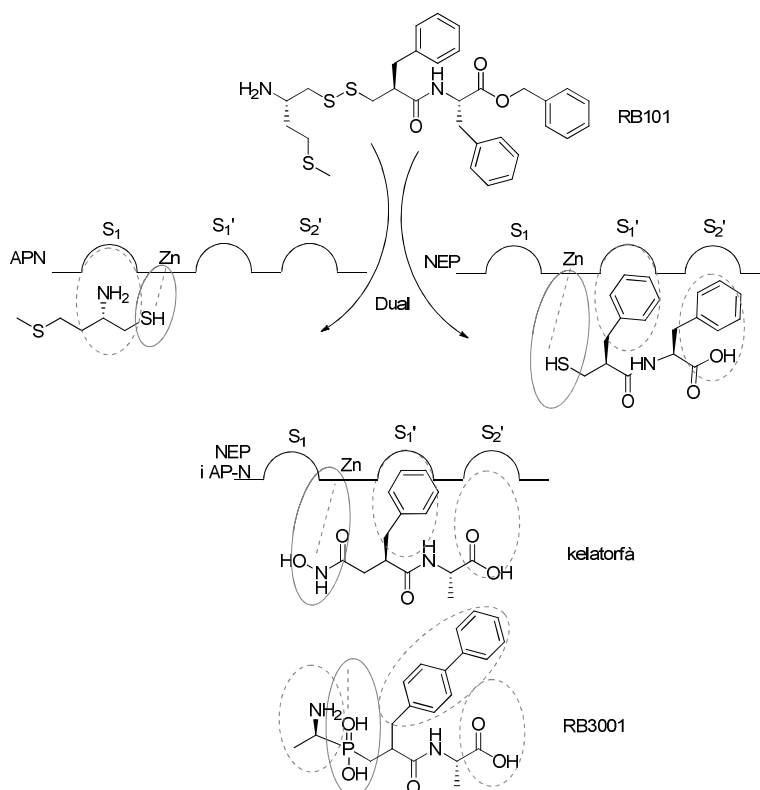


Figura 3.4. Representació esquemàtica d'inhibidors duals de AP-N i NEP simultàniament. La quimera entre dos inhibidors RB101, el compost fortament quelant kelatorfà i el compost RB3001.

3.1.4. Opiorfina, un inhibidor dual endogen

La cerca de compostos analgèsics endògens que regulin els nivells d'encefalines ha estat una alternativa per atacar el problema de la inhibició dual. Aquesta recerca va rebre un impuls considerable gràcies a la descoberta i aïllament de pèptids endògens que inhibeixen les encefalinases, a partir de teixits animals: Així, l'epiorfina (heptapèptid de seqüència H-Leu-Val-Val-Tyr-Pro-Trp-Thr-OH) fou aïllada de la medulla espinal bovina,^[109] i la sialorfina (pentapèptid H-Gln-His-Asn-Pro-Arg-OH) de teixits murins.^[110] El fruit final d'aquesta recerca, publicat poc abans de l'inici d'aquest projecte, fou l'opiorfina (H-Gln-Arg-Phe-Ser-Arg-OH) aïllada de saliva humana i descoberta pel grup de la Dra. Rougeot a l'Institut Pasteur de París.^[111] L'opiorfina presenta activitat dual per NEP i AP-N humanes. La disparitat de seqüències entre espiofina, sialorfina i opiorfina dóna una idea de la poca homologia estructural que hi ha entre aquests enzims en funció de l'espècie animal en la que es troben.

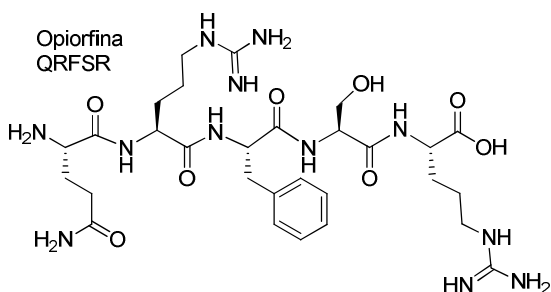


Figura 3.5. Estructura del pèptid opiorfina

Malgrat que la sialorfina és l'inhibidor natural òptim en els ratolins, l'activitat analgèsica de l'opiorfina ha estat assajada en models murins de dolor. En els tests *in vivo*, l'opiorfina ha demostrat tenir un efecte 6 vegades més potent que la morfina segons proves de dolor després d'estimulació química i mecànica. Simultàniament, no presenta efectes

secundaris com tolerància o dependència.^[111] També s'han realitzat estudis de la seva activitat ansiolítica i antidepressiva.^[112] Malgrat que aquests resultats prometedors són poc indicatius del potencial terapèutic de l'opiorfina, sobre tot per causa de la diferència entre espècies d'aquests inhibidors, l'estructura de l'opiorfina es pot considerar un bon esquelet per realitzar un disseny racional d'inhibidors duals basat en el lligand, en contraposició dels ja coneguts com el tiorfà i el kelatorfà que es basen en les dianes. Aquest treball de tesi ha volgut ser una primera contribució cap aquest disseny racional en base al lligand. Així doncs, aquest compost presenta interessants possibilitats de cara a aportar llum sobre el disseny d'inhibidors duals d'aquestes peptidases, de la mateixa manera que pot ser un perfecte candidat a optimitzar per millorar el seu perfil farmacocinètic.

3.2. Objectius

Amb l'objectiu general de contribuir a un primer disseny racional de nous productes potencialment analgèsics basats en l'estructura de l'opiorfina, Els objectius concrets en aquest capítol van consistir en:

- Estudis de relació estructura-activitat (SAR) per analitzar la importància de cada posició de la cadena peptídica i modificar la posició més crítica de cara a obtenir anàlegs amb millors propietats biològiques.
- Estudis conformacionals en solució de l'opiorfina i dels seus anàlegs per entendre la seva especificitat i mecanisme d'acció.
- Estudis SAR de l'opiorfina per acotar-ne la seva seqüència mínima activa i obtenir dades per proposar un model computacional de conformació bioactiva.

3.3. Tècniques emprades

3.3.1. Assaig FRET

El fenomen FRET, que va ser descrit per primer cop per Förster l'any 1946,^[113] es basa en la transferència d'energia de fluorescència per ressonància entre una molècula donadora i una acceptora que es troben a una distància molt propera, produint un apantallament de la fluorescència emesa pel grup donador. Förster va determinar que l'eficiència del procés depenia de l'invers de la distància entre l'acceptor i el donador elevat a la sisena, és a dir a una distància entre 1 i 10 nm.^[114]

A més de la distància ha de complir que hi hagi un solapament entre els espectres d'emissió del donador i els d'absorció de l'acceptor. (veure figura 3.6). S'han desenvolupat nombrosos parells donador-acceptor (taula 3.1).

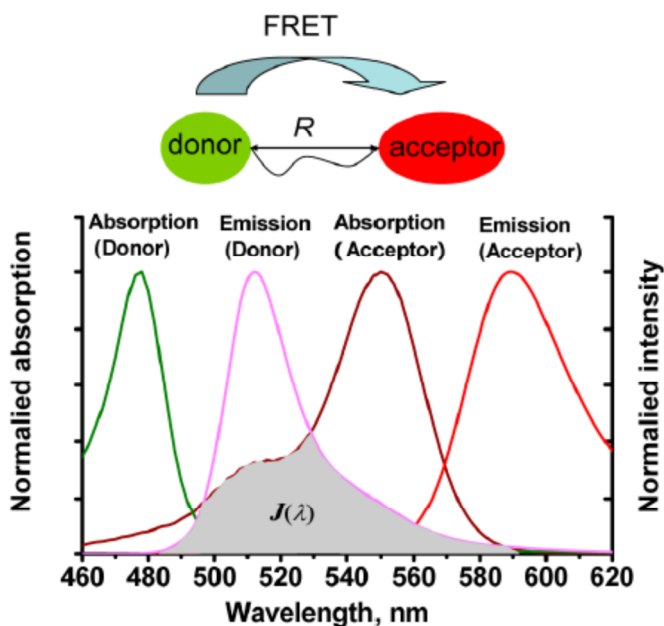


Figura 3.6. Esquema del procés FRET extret de Yuan et al.^[115]

Donador	Acceptor
Fluoresceïna	Tetrametilrodamina
IAEDANS Àcid 5-((2- [(iodoacetil)amino]etil)amino)naftalen-1- sulfònic	Fluoresceïna
EDANS Àcid 5-((2-Aminoetil)amino)naftalen-1- sulfònic	DABCYL Àcid 4-(dimetilaminoazo)benzen-4- carboxílic
Fluoresceïna	Fluoresceïna
BODIPY FL 4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacè	BODIPY FL 4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacè
MCA Àcid 7-Methoxycoumarin-4-acetic	DNP dinitrofenil
Abz Àcid 2-aminobenzoïc	EDDnp

Taula 3.1. Parelles habituals donador-acceptor en assajos FRET.

Hi ha nombroses aplicacions dels assajos basats en FRET descrites a la literatura, entre d'altres l'estudi de l'estructura i conformació de proteïnes, les interaccions receptor amb lligands o els assajos de proteases.^[116]

Els assajos *in vitro* per determinar la inhibició de NEP pels compostos sintetitzats es basen en aquest tipus d'assaig FRET.^[117] Aquests estudis es van realitzar sota la supervisió de la Dra. Catherine Rougeot a l'Institut Pasteur de Paris. Amb aquesta finalitat es va emprar el pèptid Abz-D-Arg-Gly-Leu-EDDnp com a substrat específic per NEP en els assajos de FRET.^[118] L'esmentat pèptid incorpora com a donador el grup Abz (àcid *orto*-aminobenzoïc) i el grup EDDnp (*N*¹-(2,4-dinitrofenil)etan-1,2-diamina) com a acceptor. Per tant, en ser hidrolitzats s'allunyan el donador de l'acceptor i s'observarà fluorescència.^[119]

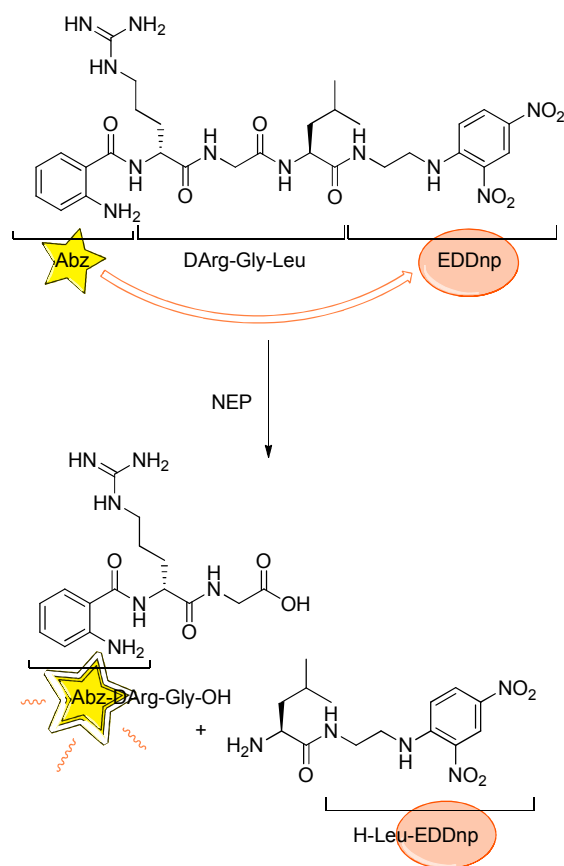


Figura 3.7. Hidròlisi del substrat fluorogènic Abz-D-Arg-Gly-Leu-EDDnp específic per NEP

L'assaig realitzat per AP-N, encara que metodològicament sigui molt similar, no es tracta realment d'un assaig FRET. En aquest cas, el substrat específic és el pèptid H-Ala-AMC, que en ser hidrolitzat per l'enzim allibera el cromòfor 7-amino-4-metilcumarina (AMC) permetent que la augmenti la conjugació dels seus enllaços i emeti fluorescència, però no es troba esmorteït en cap moment per un grup acceptor.

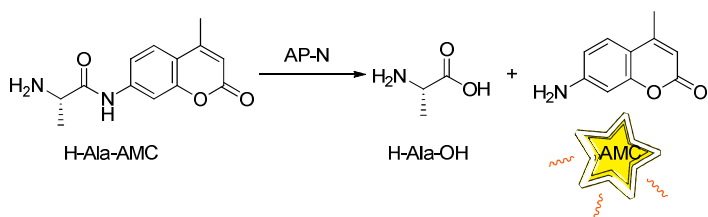


Figura 3.8. Substrat fluorogènic H-Ala-AMC.

Quan en el medi de reacció hi ha algun inhibidor de la peptidasa corresponent, s'inhibeix la degradació i, per tant, disminueix la fluorescència observada en ambdós assajos.

3.4. Resultats i discussió

Les tasques d'aquest capítol també han tingut un enfocament de química mèdica i, per tant, es presenten i discuteixen resultats realitzats per altres grups de recerca que són complementaris i donen valor als resultats de síntesi química dels quals la doctorand n'és la responsable. Així, els assajos d'activitat dels anàlegs d'opiorfina s'han dut a terme a l'Institut Pasteur de Paris, al grup de la Dra. Catherine Rougeot, que va descobrir l'opiorfina, on s'hi va realitzar una estada per aprendre les tècniques FRET i determinar l'activitat d'algunes sèries d'anàlegs de l'opiorfina. El grup del Dr. Jesús Jiménez Barbero del Centro de Investigaciones Biológicas (CIB) del CSIC de Madrid, ha contribuït amb estudis de RMN per a elucidar l'estructura en solució dels pèptids sintetitzats per entendre millor la seva activitat. Els estudis de modelització molecular de l'opiorfina i els seus anàlegs es van realitzar al Grup de Recerca en Informàtica Biomèdica (GRIB), de la Universitat Pompeu Fabra per part de les Dres. Nuria B. Centeno i Marta Pinto i han permès proposar una conformació bioactiva per l'opiorfina.

3.4.1. Síntesi d'anàlegs

Els pèptids anàlegs de l'opiorfina es van preparar per síntesi manual en fase sòlida utilitzant els protocols estàndards amb química Fmoc (*videsupra*) a partir de *building blocs* comercials i es van purificar per RP-MPLC amb el sistema de cromatografia flash *Versaflash*TM. Posteriorment, se'n va comprovar la seva puresa per RP-HPLC i es van caracteritzar per masses exactes d'alta resolució.

3.4.2. Test d'activitat

Tal com ja s'ha dit, es va realitzar una estada a l'Institut Pasteur per aprendre a realitzar els assajos d'activitat *in vitro* per NEP i AP-N mitjançant un assaig de tipus FRET. En finalitzar aquesta estada, alguns productes més van ser testats pel grup de la Dra. Rougeot. Els pèptids assajats com a inhibidors per la doctoranda es troben especificats a l'apartat de materials i mètodes corresponent: M.3.3.2.1 i M.3.3.2.2. Tots els compostos es van avaluar com a potencials inhibidors de NEP i AP-N humanes utilitzant enzims comercials solubles i substrats fluorogènics específicament dissenyats per cada enzim, Abz-D-Arg-Gly-Leu-EDDnp per NEP i Ala-AMC per AP-N, respectivament.

Durant els assajos d'inhibició, la cinètica de hidròlisi dels substrats fluorogènics produïda per les peptidases es va monitorar per fluorescència amb diferents concentracions dels inhibidors al medi per calcular-ne la IC_{50} . En condicions de mesura de velocitat inicial, hi ha una relació lineal en el temps de l'augment de fluorescència (RFU) que és proporcional a la quantitat de substrat hidrolitzat. A partir d'aquestes rectes, es pot calcular l'efecte d'inhibició corresponent a cada compost analitzat segons el tant per cent d'inhibició respecte a l'activitat de l'enzim sense inhibidor.

Cinètica d'aparició de fluorescència

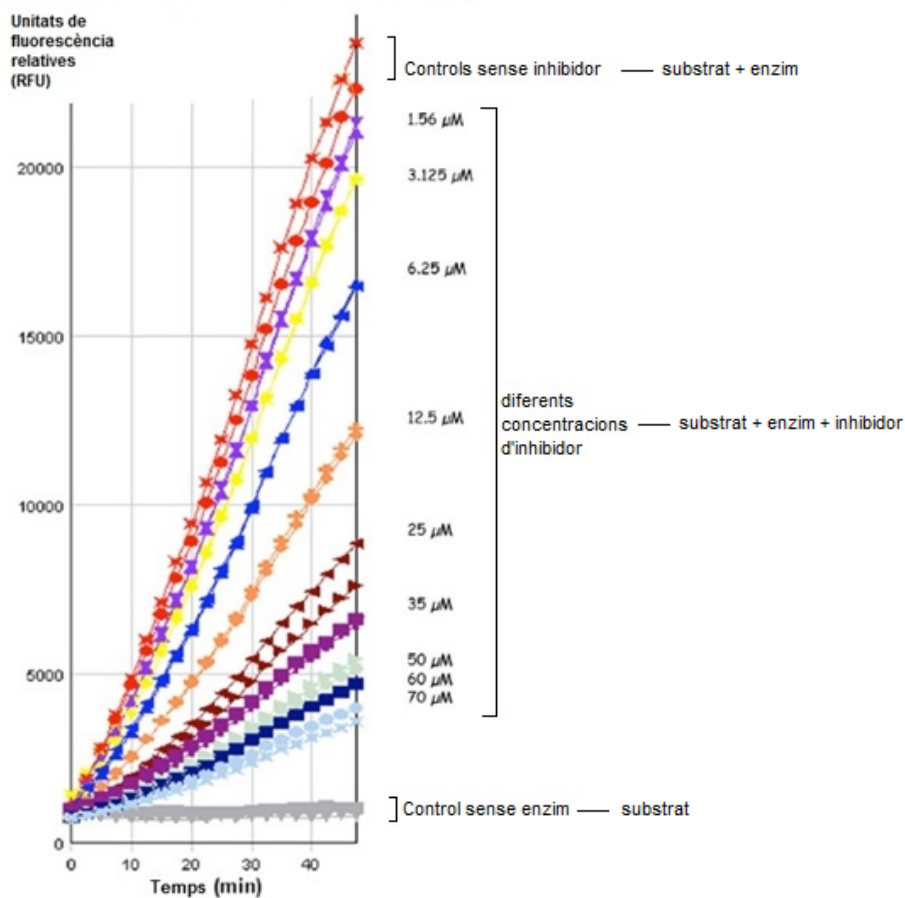


Figura 3.9. Assaig FRET amb l'enzim NEP, el substrat fluorogènic Abz-D-Arg-Gly-Leu-EDDnp i diferents concentracions del pèptid inhibidor [Phg³]-Opiorfina. La línia gris inferior correspon a un experiment control sense peptidasa (fluorescència residual del substrat fluorogènic). Les línies vermelles corresponen als experiments control amb el substrat i la peptidasa corresponent però sense inhibidor, per determinar el màxim de hidròlisi.

A partir de les cinètiques de inhibició monitorades per fluorescència com les de la figura 3.9, es van calcular les corbes dosi-resposta com la de la figura 3.10 de la qual es va obtenir la IC_{50} de cada inhibidor per cada enzim. Els càlculs s'han realitzat amb el programa Prism (GraphPad).

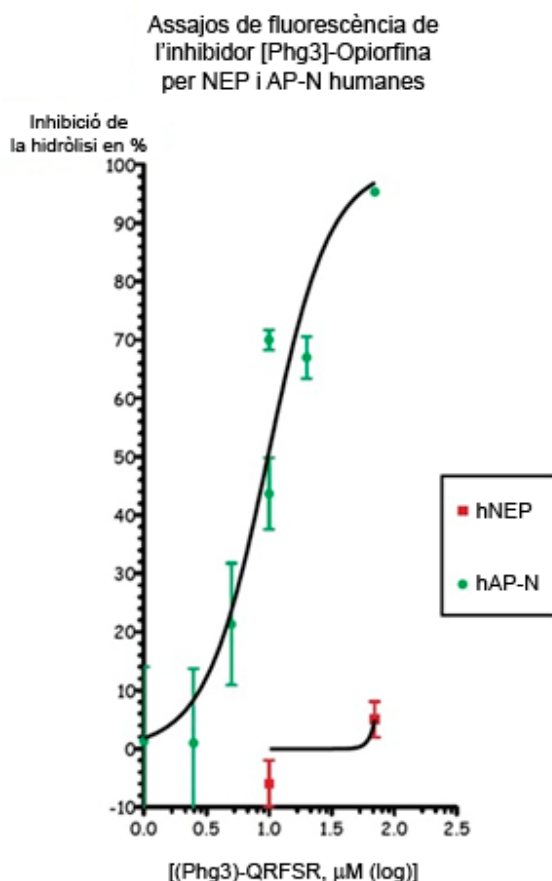


Figura 3.10. Gràfica del tant per cent d'inhibició respecte la concentració d'inhibidor en escala logarítmica. Aquests percentatges es van calcular a partir de les línies corresponents als assajos de fluorescència corresponents.

Després de calcular els valors de IC_{50} dels diferents inhibidors, els superiors a $70\mu M$ es van considerar inhibidors febles i tots aquells amb valors superiors a $100\mu M$ es van considerar compostos inactius.

3.4.3. Estudis SAR de l'opiorfina

- *Escombratge d'alanina de l'opiorfina*

Per optimitzar compostos peptídics, una primera dada a conèixer és la influència relativa de cada residu de la cadena peptídica sobre l'activitat biològica. Tradicionalment, aquest estudi consisteix en preparar una família de compostos on a cadascun es substitueix un dels aminoàcids de la cadena per un residu d'alanina (*Ala-scan*) i s'analitza l'efecte d'aquestes substitucions sobre l'activitat. Es van sintetitzar els 5 compostos corresponents i se'n va realitzar l'estudi d'activitat.

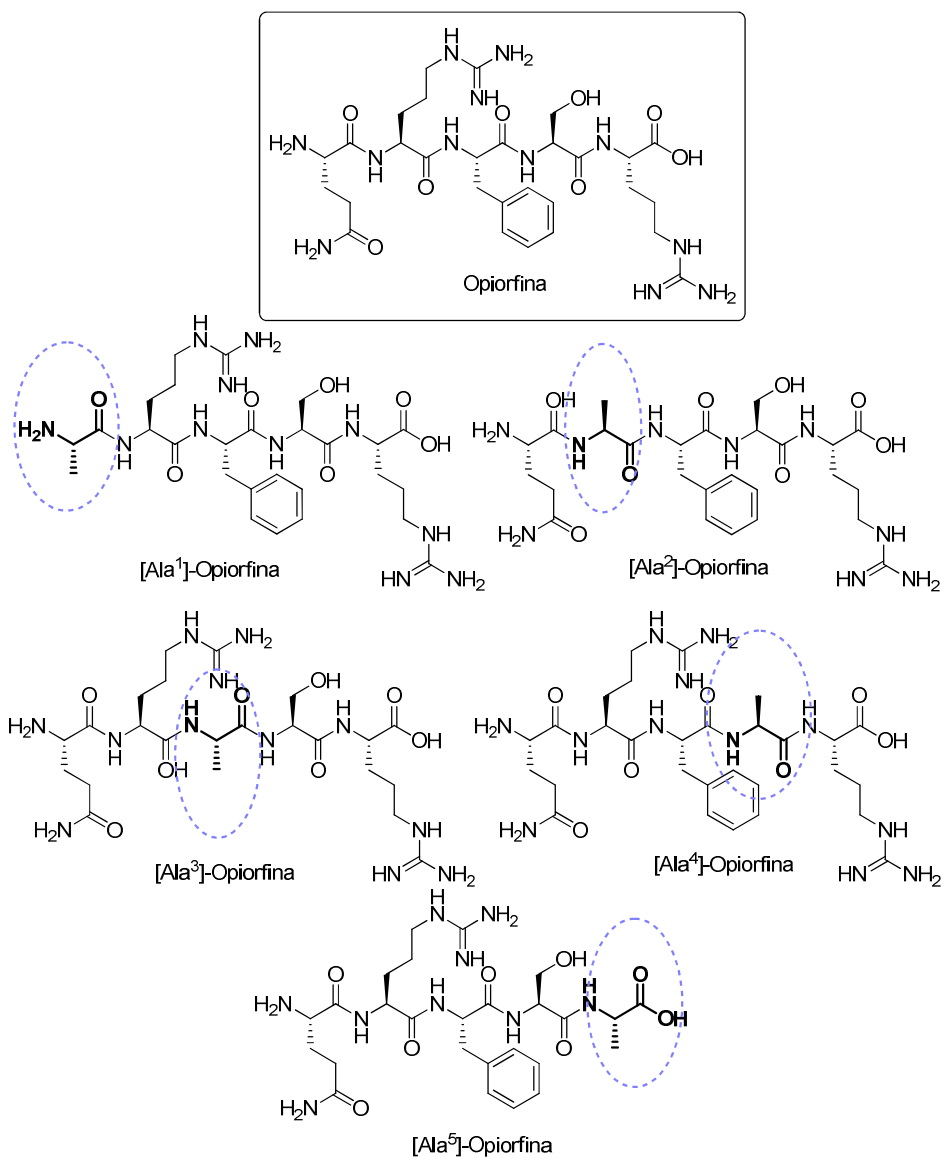


Figura 3.11. Família de pèptids sintetitzats per dur a terme l'*Ala-scan*.

Pèptids	Seqüència peptídica	IC ₅₀ AP-N (μM)	IC ₅₀ NEP (μM)
Opiorfina	H-Gln-Arg-Phe-Ser-Arg-OH	8,1 ± 0,1	30 ± 3
[Ala ¹]opiorfina	H- Ala -Arg-Phe-Ser-Arg-OH	37 ± 3	>70
[Ala ²]opiorfina	H-Gln- Ala -Phe-Ser-Arg-OH	65 ± 3	12 ± 1
[Ala ³]opiorfina	H-Gln-Arg- Ala -Ser-Arg-OH	>70	>100
[Ala ⁴]opiorfina	H-Gln-Arg-Phe- Ala -Arg-OH	47 ± 2	39 ± 2
[Ala ⁵]opiorfina	H-Gln-Arg-Phe-Ser- Ala -OH	>70	33 ± 2

Taula 3.2. Resultats d'activitat *in vitro* d'inhibició per NEP i AP-N humanes d'opiorfina i de la família d'anàlegs Ala-substituïts.

D'aquests resultats, s'observa d'entrada que totes les substitucions van empitjorar l'efecte inhibitori propi de l'opiorfina, de manera més o menys remarcada, cap a una o l'altra peptidasa. Sembla doncs que tots els residus tenen un paper en la interacció ja sigui amb NEP o AP-N. Tanmateix, aquestes dades posen de manifest la importància del residu de Phe³ per l'activitat dual del compost, doncs l'absència d'aquest fa perdre l'efecte inhibitori simultàniament per ambdós enzims. Aquesta interacció crucial, tant amb NEP com amb AP-N ens va fer considerar aquest residu com un bon objectiu per realitzar-ne un primer estudi SAR.

- *Anàlegs de l'opiorfina a la posició Phe³*

Tal com ja s'ha dit, a causa de la importància de Phe³ per a la potència inhibidora de l'opiorfina tant per NEP com per AP-N, es va escollir una sèrie de d'anàlegs on aquesta posició es trobava substituïda per aminoàcids com la Phg (nor-Phe) o la Hhe (homo-Phe), amb isòmers com la D-Phe, amb derivats com la 4-hidroxi-Phe (Tyr), la 4-metil-Phe i la 4-benzoil-Phe (Bpa); o motius que poguessin aportar un augment de l'estabilitat metabòlica a l'opiorfina, tals com la Nphe o la D-β-Phe. De fet, substitucions en un residu de Phe com aquestes s'havien descrit de

forma similar en altres pèptids bioactius anteriorment a la literatura, en concret per a la nociceptina i la endomorfina-2.^[120] Per aquest motiu, es varen adquirir els *building blocks* comercialment disponibles corresponents als sintons indicats a la figura 3.12 per sintetitzar els inhibidors que posteriorment es van assajar *in vitro*.

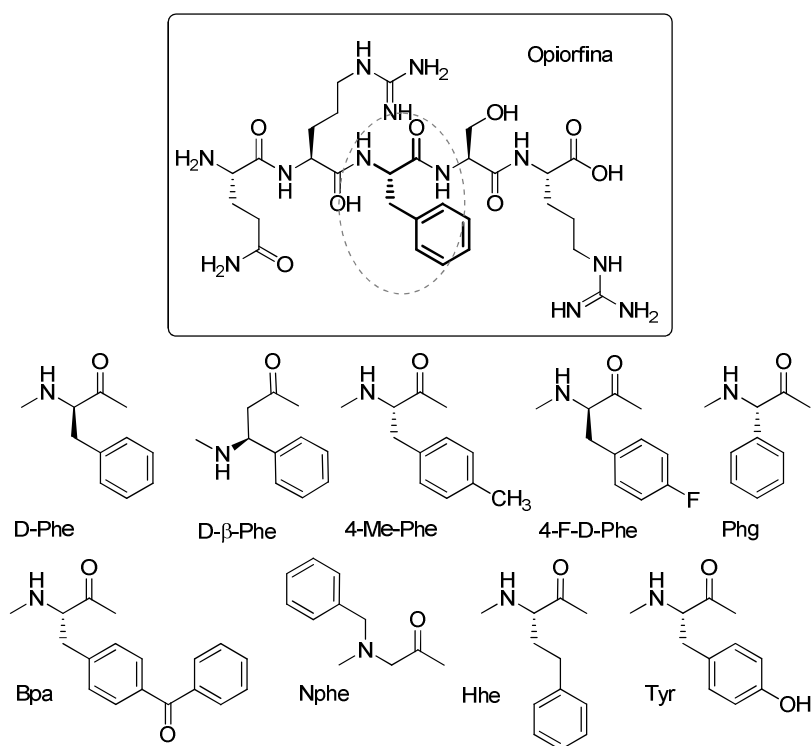


Figura 3.12. Modificacions en la Phe³ dels anàlegs d'opiorfina sintetitzats.

Pèptids	Seqüència peptídica	IC ₅₀ AP-N (μM)	IC ₅₀ NEP (μM)
Opiorfina	H-Gln-Arg-Phe-Ser-Arg-OH	8,1 ± 0,1	30 ± 3
[D-Phe ³]opiorfina	H-Gln-Arg- D-Phe -Ser-Arg-OH	0,5 ± 0,1	>100
[4-F-D-Phe ³]opiorfina	H-Gln-Arg-(p-F)- D-Phe -Ser-Arg-OH	0,5 ± 0,1	>100
[D-β-Phe ³]opiorfina	H-Gln-Arg- D-β-Phe -Ser-Arg-OH	>70	>100
[Hhe ³]opiorfina	H-Gln-Arg- Hhe -Ser-Arg-OH	54 ± 10	70 ± 10
[Phg ³]opiorfina	H-Gln-Arg- Phg -Ser-Arg-OH	10 ± 3	>100
[Tyr ³]opiorfina	H-Gln-Arg- Tyr -Ser-Arg-OH	64 ± 5	70 ± 10
[4-Me-Phe ³]opiorfina	H-Gln-Arg-(p-Me)- Phe -Ser-Arg-OH	45 ± 4	>100
[Bpa ³]opiorfina	H-Gln-Arg- Bpa -Ser-Arg-OH	30 ± 3	>100
[Nphe ³]opiorfina	H-Gln-Arg- Nphe -Ser-Arg-OH	>100	>100
[Cys ⁰ , D-Phe ³]opiorfina	H- Cys -Gln-Arg- D-β-Phe -Ser-Arg-OH	0,7 ± 0,1	>100

Taula 3.3. Activitat inhibidora d'AP-N i NEP per opiorfina i els seus anàlegs en posició 3.

Tal i com s'observa a la taula 3.2, cap dels 8 compostos assajats va mantenir l'efecte dual com a inhibidors de NEP i AP-N. És més, petits canvis estructurals (canviant Phe per Hhe, Phg o Nphe) van afectar de manera dràstica a NEP, tot i que van preservar en part la inhibició sobre AP-N. El cas més notori és el de [D-Phe³]opiorfina que, tot i perdre l'activitat contra NEP, és un ordre de magnitud més potent contra AP-N que l'opiorfina original. D'altra banda, la substitució per D-Phe va tolerar perfectament la presència d'un àtom de fluor en posició *para*- a l'anell aromàtic de la D-Phe, ja que l'activitat corresponent a ambdós compostos va resultar idèntica. El compost amb Bpa es va assajar en vistes a un possible experiment de marcatge per fotoafinitat (*photoaffinity labeling*),^[121] que no es va dur a terme degut a la baixa inhibició aconseguida pel compost.

- ***Halogenació d'opiorfina per induir enllaç d'halogen***

Per aprofundir en el primer estudi SAR en la posició 3 de l'opiorfina i ja que aquest residu lateral aromàtic és un motiu estructural adequat per introduir-hi àtoms halogenats, es va considerar oportú realitzar un segon estudi SAR per avaluar la possibilitat de induir noves interaccions estabilitzants entre opiorfina i les dues peptidases esmentades, seguint una estratègia basada en l'enllaç d'halogen tal i com la descrita en el capítol 2. Per tant, utilitzant diferents *building blocks* comercials de fenilalanina halogenada en diferents posicions de l'anell, es van sintetitzar els corresponents anàlegs d'opiorfina i aquests es van provar en l'assaig *in vitro*.

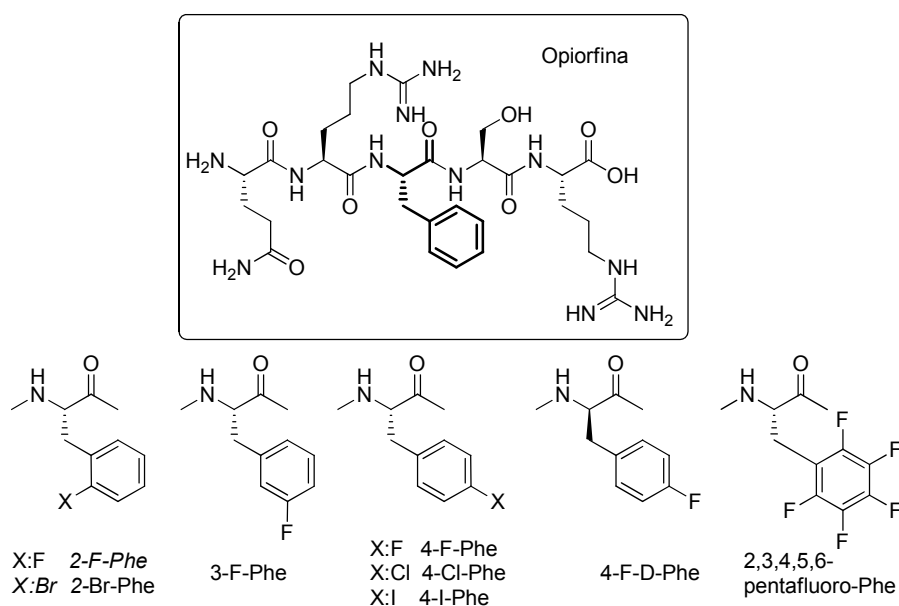


Figura 3.13. Modificacions en la Phe³ dels anàlegs halogenats d'opiorfina sintetitzats.

Pèptids	Seqüència peptídica	IC ₅₀ AP-N (μM)	IC ₅₀ NEP (μM)
Opiorfina	H-Gln-Arg-Phe-Ser-Arg-OH	8,1 ± 0,1	30 ± 3
[2-F-Phe ³]opiorfina	H-Gln-Arg-(o-F)-Phe-Ser-Arg-OH	44 ± 3	48 ± 3
[2-Br-Phe ³]opiorfina	H-Gln-Arg-(o-Br)-Phe-Ser-Arg-OH	65 ± 4	30 ± 2
[3-F-Phe ³]opiorfina	H-Gln-Arg-(m-F)-Phe-Ser-Arg-OH	>100	>100
[4-F-Phe ³]opiorfina	H-Gln-Arg-(p-F)-Phe-Ser-Arg-OH	13,5 ± 0,5	>100
[4-F-D-Phe ³]opiorfina	H-Gln-Arg-(p-F)- D -Phe-Ser-Arg-OH	0,5 ± 0,1	>100
[4-Cl-Phe ³]opiorfina	H-Gln-Arg-(p-Cl)-Phe-Ser-Arg-OH	48 ± 5	70 ± 10
[4-I-Phe ³]opiorfina	H-Gln-Arg-(p-I)-Phe-Ser-Arg-OH	30 ± 3	>100
[2,3,4,5,6-pentafluoroPhe ³]opiorfina	H-Gln-Arg-(2,3,4,5,6-pentafluoro)-Phe-Ser-Arg-OH	>100	>100

Taula 3.4. Resultats d'activitat *in vitro* d'inhibició per NEP i AP-N humanes d'opiorfina i de la família d'anàlegs halogenats en Phe³.

Com s'observa a la taula 3.4, cap dels compostos va mostrar una activitat inhibidora dual per NEP i AP-N major que la pròpia opiorfina. Fins i tot, en la substitució per halogen en posició *para*- es correlaciona una disminució d'activitat segons l'augment estèric d'aquest (F<Cl<I). La mateixa situació es pot observar a la posició *orto*- (F<Br). Aquestes evidències són una indicació de que no s'indueixen noves interaccions d'estabilització del tipus d'enllaç d'halogen, ans el contrari, es produeixen impediments estèrics que empitjoren l'activitat dels compostos. Així mateix, la fluoració en posició meta i la perfluoració, tot i tractar-se d'un àtom petit, tenen un efecte dràstic sobre l'activitat inhibidora.

- *Anàlisi conformacional per RMN de l'opiorfina i els seus anàlegs*

Per tal de racionalitzar els resultats obtinguts sobre els anàlegs en Phe³ des d'una perspectiva estructural, el grup del Dr. Jesús Jiménez Barbero va realitzar estudis de conformació en solució d'alguns compostos. Es van analitzar concretament l'opiorfina, [D-Phe³]opiorfina i els seus anàlegs fluorats en posició *para*-. Pel fet de ser un pèptid petit, era esperable que l'opiorfina no presentés una conformació definida en solució. Malgrat tot, es van realitzar experiments d'assignació d'índexs de desplaçaments químics (CSIs), es van realitzar anàlisis de les constants d'acoblament i es van emprar mètodes de RMN en 2D, per identificar possibles efectes NOE i així comprovar la proximitat de les cadenes laterals de diferents aminoàcids.

Aquests anàlisis van verificar l'existència de tendències estructurals ben diferenciades entre la [L-Phe³]opiorfina natural i el seu anàleg [D-Phe³], tot i que no es van observar diferències significatives respecte els seus anàlegs fluorats. Les dades experimentals observades mostren una interacció CH- π *stacking*^[122] entre l'anell aromàtic de Phe³ i els H γ de la Arg² presents a [D-Phe³]opiorfina que no es troba al compost natural, per l'apantallament d'aquests i l'efecte NOE trobat.

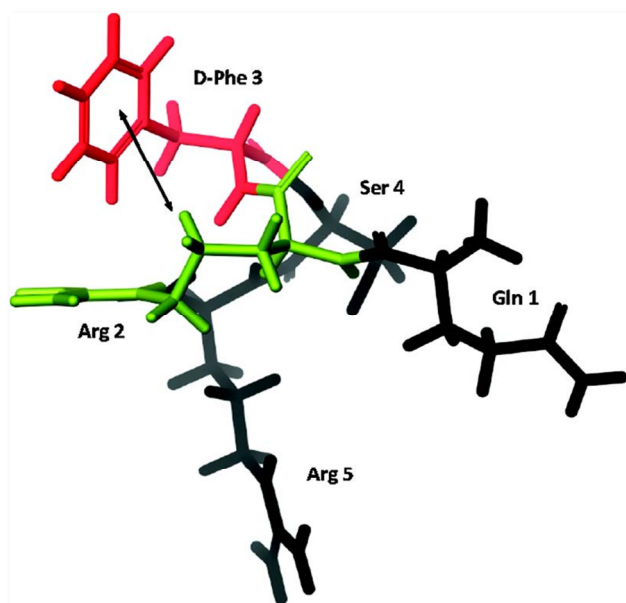


Figura 3.14. Model estructural del pèptid [D-Phe³]opiorfina mostrant la interacció entre els protons H_γ de l'arginina en posició 2 (en verd) i l'anell aromàtic de la D-Phe en posició 3 (en vermell).

Amb aquestes dades i la informació de les constants d'acoblament introduïdes al programa Macromodel 10.0 (Schrödinger Inc.), es van construir els models de les estructures 3D en solució d'ambdós isòmers que es presenten a la figura 3.15. A l'article "Structure–Activity Relationship Study of Opiorphin, a Human Dual Ectopeptidase Inhibitor with Antinociceptive Properties", adjunt a l'annex, s'inclou una anàlisi més detallat de les conformacions.

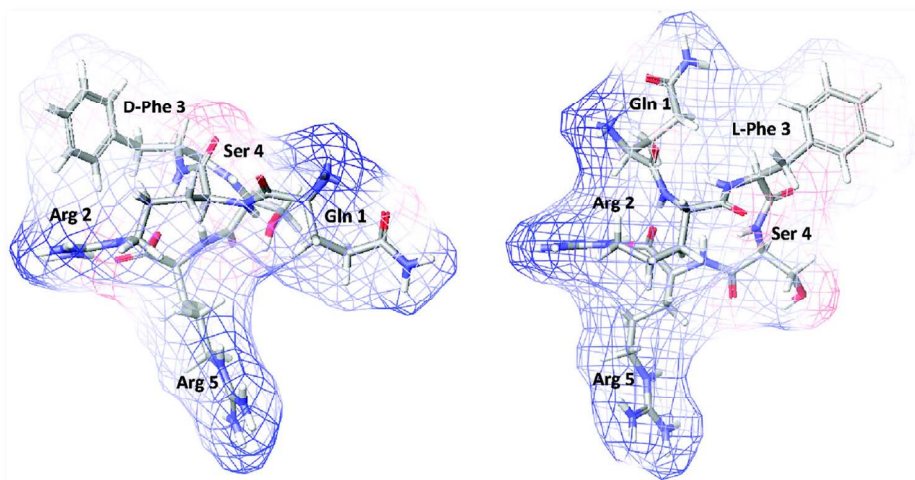


Figura 3.15. Conformacions en solució de [D-Phe³]opiorfina i [L-Phe³]opiorfina amb les corresponents superfícies de potencial electrostàtic simulades per Macromodel 10.0 (Schrödinger Inc.).

- *Anàlegs a la posició Ser⁴*

El fet que l'aminoàcid serina, en posició 4 de l'opiorfina, demostrés en l'*Ala-scan* ser poc crucial per la seva activitat i com que conté un grup hidroxil de manera natural a la seva estructura, ens va aportar un nou punt d'interès pel seu estudi ja que aquest hidroxil permetria la formació d'anàlegs *O*-glicosilats que podrien tenir, per exemple, millors propietats ADME que la mateixa opiorfina.

D'aquesta manera es va proposar un tercer estudi SAR per substitució de Ser⁴ per anàlegs amb una certa similitud a la Ser i per glicoconjugats de l'opiorfina.

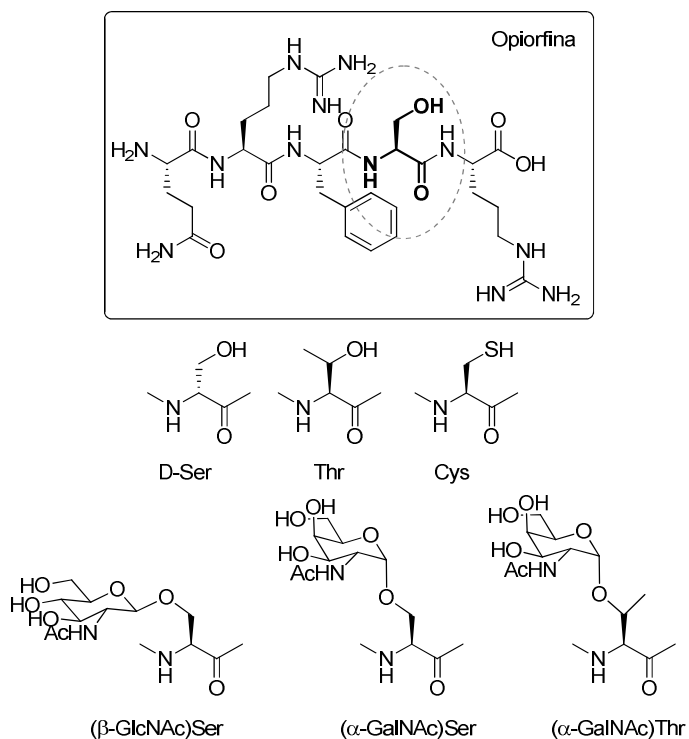


Figura 3.16. Modificacions en la Ser⁴ dels anàlegs d'opiorfina sintetitzats.

Pèptids	Seqüència peptídica	IC ₅₀ AP-N	IC ₅₀ NEP
		(μM)	(μM)
Opiorhina	H-Gln-Arg-Phe-Ser-Arg-OH	8,1	30
[D-Ser ⁴]opiorfina	H-Gln-Arg-Phe- D Ser-Arg-OH	85	>100
[Cys ⁴]opiorfina	H-Gln-Arg-Phe- Cys -Arg-OH	20	>100
[Thr ⁴]opiorfina	H-Gln-Arg-Phe- Thr -Arg-OH	>100	>100
[(α-GalNAc)Thr ⁴]opiorfina	H-Gln-Arg-Phe- Thr (O-α-GalNAc)-Arg-OH	>100	>100
[(α-GalNAc)Ser ⁴]opiorfina	H-Gln-Arg-Phe- Ser (O-α-GalNAc)-Arg-OH	32	>100
[(β-GlcNAc)Ser ⁴]opiorfina	H-Gln-Arg-Phe- Ser (O-β-GlcNAc)-Arg-OH	52	>100

Taula 3.5. Activitat inhibidora per NEP i AP-N per opiorfina i els seus anàlegs en posició 4.

Com es pot extreure dels resultats a la taula 3.5, per causa d'aquestes substitucions a la posició Ser⁴, cap dels compostos sintetitzats presenta la capacitat inhibidora respecte NEP, de la mateixa manera que disminueix un ordre de magnitud respecte AP-N. En resum, les substitucions assajades mostren un empitjorament de l'activitat per sobre del llinar plantejat, de manera que no resulten una opció pràctica per millorar les propietats biològiques del compost natural.

- ***Anàlegs a les posicions Arg² i Arg⁵***

Un altre aminoàcid de l'opiorfina en el que hem aplicat un petit estudi SAR és l'arginina (Arg). Aquest aminoàcid es troba tant en posició 2 com en posició 5 de la cadena peptídica de l'opiorfina. A més de la substitució per l'aminoàcid alanina en ambdues posicions, inclosa a l'apartat d'*Ala-scan*, es va analitzar l'efecte de la seva substitució per altres aminoàcids com són la lisina (Lys), aminoàcid igualment bàsic però amb una volum menor a l'extrem de la cadena (grup amino enlloc de guanidini), i la citrul·lina (Cit), aminoàcid que conté un grup carbamoïlamino en lloc del guanidini, per tant, és un bioisòster de l'arginina amb una millor estabilitat metabòlica per la substitució d'un àtom de N per O.

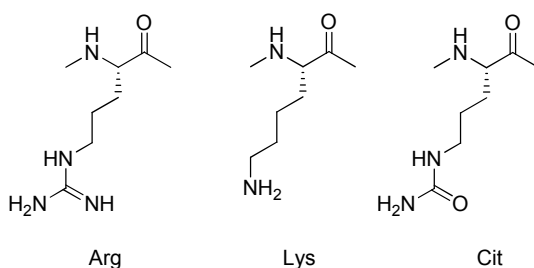


Figura 3.17. Estructura dels aminoàcids arginina, lisina i citrul·lina.

Pèptids	Seqüència peptídica	IC ₅₀ AP-N (μM)	IC ₅₀ NEP (μM)
Opiorfina	H-Gln-Arg-Phe-Ser-Arg-OH	8,1 ± 0,1	30 ± 3
[Ala ²]opiorfina	H-Gln- Ala -Phe-Ser-Arg-OH	65 ± 3	12 ± 1
[Ala ⁵]opiorfina	H-Gln-Arg-Phe-Ser- Ala -OH	>70	33 ± 2
[Lys ²]opiorfina	H-Gln- Lys -Phe-Ser-Arg-OH	>70	50
[Lys ⁵]opiorfina	H-Gln-Arg-Phe-Ser- Lys -OH	>70	35
[Cit ²]opiorfina	H-Gln- Cit -Phe-Ser-Arg-OH	22 ± 3	90 ± 14
[Cit ⁵]opiorfina	H-Gln-Arg-Phe-Ser- Cit -OH	62 ± 7	>100

Taula 3.6. Activitat inhibidora per NEP i AP-N per opiorfina i els seus anàlegs en posició 2 i 5.

Com es pot extreure dels resultats a la taula 3.5, la substitució d'Arg per Ala o per Lys, en ambdues posicions, afecta greument a la inhibició d'AP-N, mentre que ho fa en menor grau a la inhibició de NEP. L'efecte és diferent a les substitucions per Cit, ja que s'hi veu més afectada la inhibició de NEP que la d'AP-N, tot i que també empitjora. Tot i que a l'Ala-scan semblava que el residu d'Arg² permetria introduir-hi alguna modificació en la seva posició, en realitzar aquestes substitucions es van observar pèrdues d'activitat dual en major o menor grau per cada enzim.

- ***Conclusions dels estudis SAR***

Dels estudis SAR s'ha pogut concloure que l'opiorfina presenta una sèrie de requeriments estructurals per mantenir la seva activitat dual o individual en front de NEP i AP-N, com ara:

- L'extrem *N*-terminal és necessari per l'activitat inhibidora per NEP, mentre que l'extrem *C*-terminal és indispensable per l'activitat inhibidora per AP-N.
- La Phe³ és el residu clau per l'activitat d'opiorfina en ambdós enzims.
- L'halogenació en *orto*- o *para*- de l'anell de Phe³, sembla que no indueix cap interacció d'enllaç d'halogen en el centre actiu.
- Qualsevol canvi estructural en Phe³ fa desaparèixer l'activitat dual, tot i que la substitució per D-Phe augmenta l'activitat inhibidora per AP-N.
- Malgrat l'opiorfina és un pèptid petit, l'estudi de la conformació en solució per RMN mostra que existeixen diferents tendències estructurals entre l'opiorfina natural i el seu anàleg amb D-Phe³.
- Tot i que l'escombrat d'alanines (*Ala-scan*) en la seqüència de l'opiorfina semblava indicar que es podrien fer modificacions als aminoàcids Ser⁴ i Arg² sense perdre totalment l'activitat, s'ha trobat que:
 - a) La glicosilació de la Ser⁴ amb diferents monosacàrids fa disminuir molt l'activitat.
 - b) La substitució tant per Lys com per Cit en les Arg² i Arg⁵ fa perdre l'activitat dual.

3.4.4. Proposta de conformació bioactiva de l'opiorfina

El coneixement de la conformació bioactiva de lligands de dianes terapèutiques s'ha mostrat com un punt de partida important en el desenvolupament de nous fàrmacs. En cas de que l'estructura de la diana sigui coneguda o, millor, si hi ha informació cristal·logràfica de complexos lligand-diana, l'elucidació d'aquesta conformació és molt més obvia que en els casos contraris. Quan no es disposa de l'estructura detallada de la diana, tan sols resten mètodes indirectes per la seva predicció.

Aquest darrer és el cas de l'opiorfina i, per tant, en aquest treball hem aplicat un mètode indirecte per proposar conformacions bioactives per NEP i AP-N que es basa en la combinació de dades experimentals i càlculs computacionals. Pel que fa a la part computacional l'han realitzat les Dres. Marta Pinto i Nuria B. Centeno de la Universitat Pompeu Fabra mentre que la part experimental de síntesi ha estat responsabilitat de la doctoranda que subscriu aquesta tesi.

Com en altres lligands peptídics, s'ha aplicat un mètode que consisteix bàsicament en dividir la seqüència de l'opiorfina en petites unitats. Aquestes seqüències han estat sintetitzades i s'han avaluat biològicament. Això ha permès fer dos grups de productes per a cadascun dels dos enzims estudiats, per una banda, un grup de productes actius ($IC_{50} < 100 \mu M$) i un altre de inactius ($IC_{50} > 100 \mu M$) (Taula 3.7).

Pèptids	Seqüència peptídica	IC ₅₀ AP-N (μM)	IC ₅₀ NEP (μM)
Opiorfina	H-Gln-Arg-Phe-Ser-Arg-OH	8,1 ± 0,1	30 ± 3
Opiorfina(3-5)	H-Phe-Ser-Arg-OH	>100	7
Opiorfina(2-5)	H-Arg-Phe-Ser-Arg-OH	27	>100
Opiorfina(1-4)	H-Gln-Arg-Phe-Ser-OH	75	>100
[Asn ¹]opiorfina	H- Asn -Arg-Phe-Ser-Arg-OH	>100	>100
[Thr ⁴]opiorfina	H-Gln-Arg-Ala- Thr -Arg-OH	70	>100
[Phe ⁰]opiorfina	H- Phe -Gln-Arg-Phe-Ser-Arg-OH	>100	51 ± 7
[Cys ⁰]opiorfina	H- Cys -Gln-Arg-Phe-Ser-Arg-OH	0,8 ± 0,1	7 ± 3

Taula 3.7. Relació de compostos actius i inactius utilitzats per l'anàlisi computacional de conformacions amb la seva activitat *in vitro* respecte NEP i AP-N. Els compostos amb IC₅₀ inferior a 100μM es consideren actius, mentre els de IC₅₀ superior a aquest valor es consideren inactius de cara a l'anàlisi.

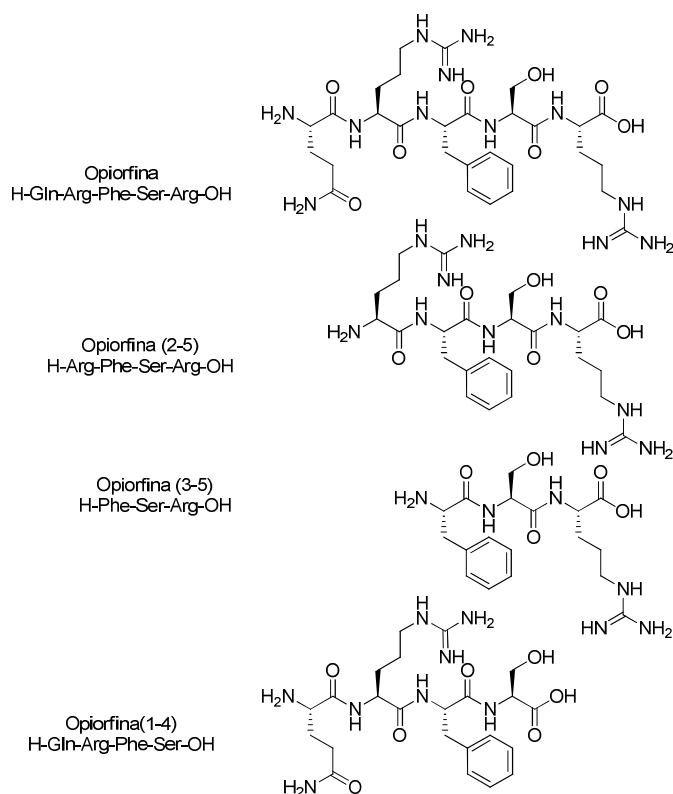


Figura 3.18. Estructura dels pèptids de tipus fragment d'opiorfina utilitzats per l'anàlisi computacional.

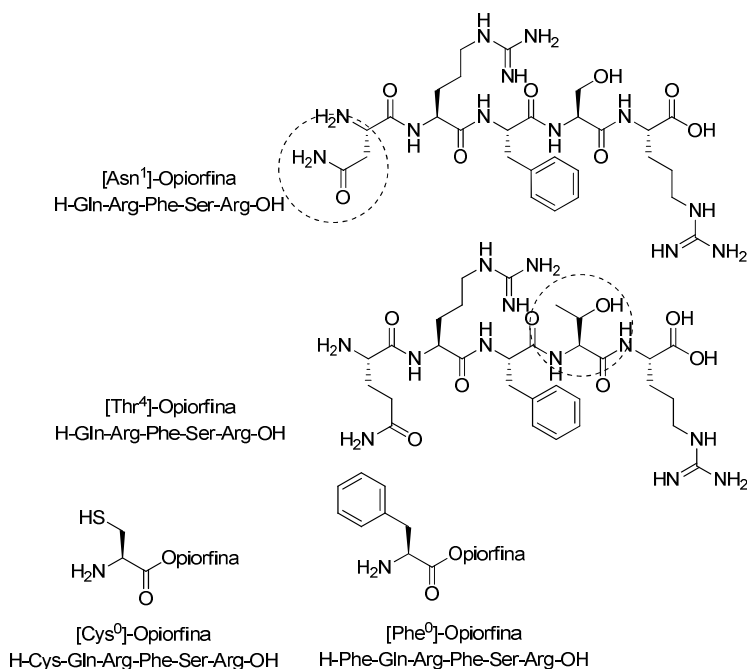


Figura 3.19. Estructura dels pèptids anàlegs d'opiorfina i de seqüència elongada utilitzats per l'anàlisi computacional.

Per a pèptids de mida mitjana (fins a 9 residus) hi ha tot un seguit de metodologies computacionals que permeten explorar el seu espai conformacional, identificant les conformacions de més baixa energia.^[123] En aquest estudi es va fer servir el mètode anomenat *Iterative simulated annealing procedure* (procediment de recuit simulat iteratiu)^[124]

Resumidament, aquest procediment consisteix en cicles de simulacions de dinàmica molecular que comencen a 900 K i es va disminuint fins arribar a 300 K. La conformació que resulta, per una banda, es minimitza i, per l'altra, és el punt de partida d'un nou cicle que comença amb una escalfament molt ràpid des de 300 K fins a 900 K. El cicles d'escalfament-refredament continuen fins que al conjunt de conformacions minimitzades no apareix cap conformació nova de baixa energia. Aquest procediment assegura una exploració completa de les

conformacions de baixa energia del pèptid.^[125] A aquest conjunt de conformacions minimitzades s'hi va aplicar el paradigma de que la conformació bioactiva es trobarà en el conjunt de les conformacions de baixa energia dels compostos actius i no serà cap de les conformacions de baixa energia dels compostos inactius.^[126]

D'aquesta manera es va seleccionar una conformació bioactiva per AP-N i dues possibles per NEP. Aquestes dues, aprofitant la informació cristal·logràfica disponible, es van comparar les dues conformacions per NEP amb la conformació dels lligands dipeptídics ja descrits^[99a, 99b] i, per similitud, se'n va poder seleccionar una. A la informació suplementària de l'article "Proposed Bioactive Conformations of Opiorphin, an Endogenous Dual APN/NEP Inhibitor", adjunt a l'annex, s'inclou informació més detallada sobre el procés de generació de confòrmers i el mètode de selecció.

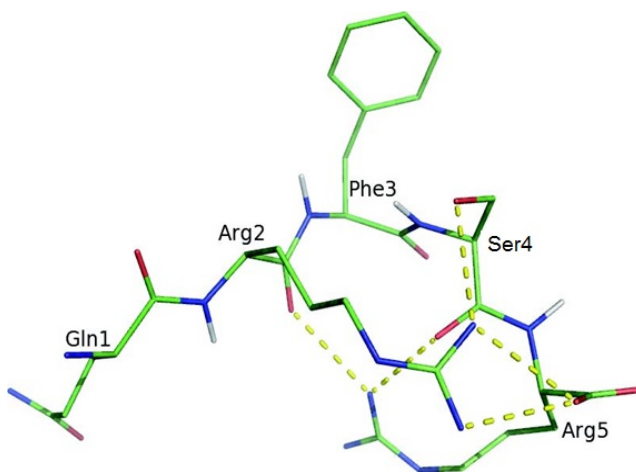


Figura 3.20. Representació de l'estructura 3D d'opiorfina en la conformació bioactiva proposada per inhibir AP-N. Les línies grogues discontinües indiquen enllaços d'hidrogen intramoleculars. Els àtoms d'hidrogen de les cadenes laterals s'han omès per tenir més claredat.

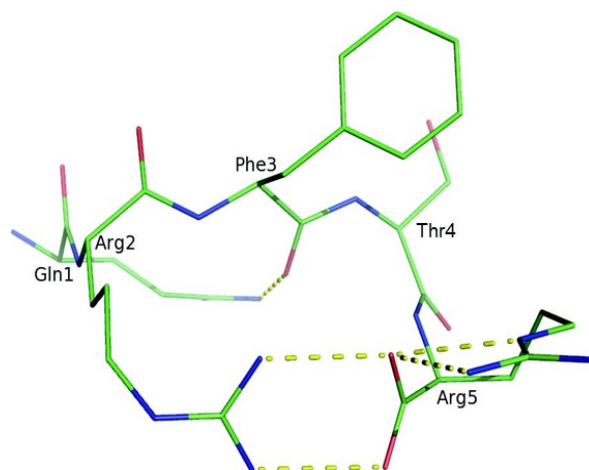


Figura 3.21. Representació de l'estructura 3D d'opiorfina en la conformació bioactiva proposada per inhibir NEP. Les línies grogues discontinües indiquen enllaços d'hidrogen intramoleculars. Els àtoms d'hidrogen de les cadenes laterals s'han omès per tenir més claredat.

Així doncs, es va assignar una conformació bioactiva per AP-N (figura 3.20) i una altra per NEP (figura 3.21), aquestes presenten moltes diferències, com es pot observar clarament en la superposició d'estructures a la figura 3.22, de manera que l'activitat dual de l'opiorfina no sembla correspondre a una sola conformació bioactiva sinó a la flexibilitat innata del pèptid que li permet adoptar formes diferents davant de cada enzim.

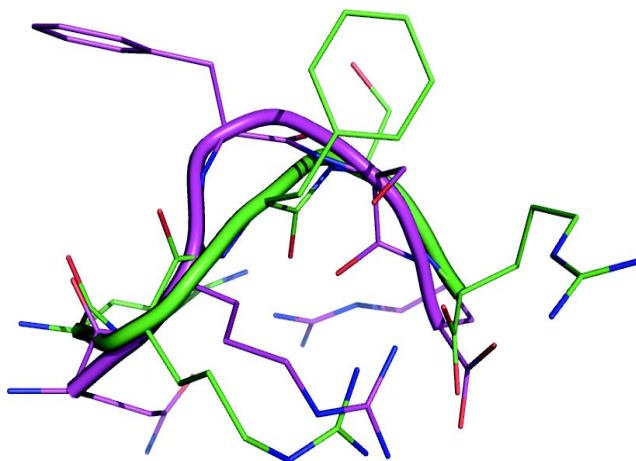


Figura 3.22. Superposició de l'esquelet atòmic de les conformacions bioactives proposades per AP-N (en violeta) i NEP (en verd). S'indica amb traç més gruixut la forma bàsica de l'esquelet per remarcar-ne diferències.

Aquest resultat emfatitza la dificultat per aconseguir un inhibidor dual simultani per NEP i AP-N. A l'article ja esmentat, adjunt a l'annex, s'inclou una anàlisi més detallat de les conformacions.

3.5. Conclusions

- A partir dels estudis SAR de diferents residus d'opiorfina s'ha pogut concloure que:
 - a. L'extrem *N*-terminal és necessari per l'activitat inhibidora per NEP, mentre que l'extrem *C*-terminal és indispensable per l'activitat inhibidora per AP-N.
 - b. La Phe³ és el residu clau per l'activitat d'opiorfina en ambdós enzims.
 - c. Encara que a l'estudi SAR no s'hagi obtingut un millor inhibidor dual que la pròpia opiorfina, s'ha identificat una estratègia per incrementar la potència respecte AP-N que possiblement també comporti una millora del perfil ADME l'inhibidor (com és la substitució per D-Phe).
- L'estudi de la conformació en solució per RMN, mostra que existeixen diferents tendències estructurals entre l'opiorfina natural i el seu anàleg amb D-Phe³.
- L'estudi computacional ha permès suggerir diferents conformacions bioactives respecte ambdues peptidases que presenten grans diferències.

Materials i mètodes

M.1. Reactius

Els reactius generals i sals per tampons es van adquirir a Sigma-Aldrich o Panreac, de qualitat analítica.

Els dissolvents habituals es van adquirir a Scharlau o Thermo-Fisher Scientific. Els dissolvents anhidres es van comprar sobre tamís a Aldrich o es van purificar a través del sistema anhidritzador SPS de Scharlab. L'H₂O MilliQ es va desionitzar i filtrar emprant el l'equip Sartorius Arium® 611 amb una resistivitat de 18MΩ/cm a 25°C.

Els reactius específics per electroforesis es van adquirir a BioRad i Thermoscientific. El Coomassie Brilliant Blue G-250 es va comprar a Sigma. Els enzims per les digestions es van adquirir a Promega. Les matrius emprades per MALDI-TOF, així com els pèptids calibrants, es van comprar a Aldrich. Els anticossos emprats al Western Blot, així com el kit revelador provenien de GE Healthcare, mentre que la membrana es va adquirir a BioRad i la llet desnatada va ser de la marca Nestlé Sveltesse.

Les sals per tampons i reactius generals emprats durant l'estada a Toulouse es van comprar a Sigma-Aldrich. Els medis de cultiu cel·lular, així com els seus additius i antibiòtics es van adquirir a Invitrogen. La diprenorfina tritiada provenia de Perkin-Elmer. Els reactius específics per l'electroforesis, així com la membrana per Western Blot es van adquirir a BioRad. L'anticòs primari emprat al Western Blot es va comprar a Sigma, mentre que el secundari provenia de Jackson Immuno research. El kit revelador emprat es va adquirir a GE Healthcare.

El reactiu de iodació IPy_2BF_4 es va rebre del laboratori del Prof. Barluenga de la Universitat de Oviedo. Les proteïnes emprades a la posada a punt del mètode es van adquirir a Aldrich i Thermo-Fisher Scientific.

Els aminoàcids protegits, resines i reactius per la síntesi de pèptids es van adquirir a Bachem, Novabiochem i Aldrich.

Les sals per tampons i reactius generals emprats durant l'estada a l'Institut Pasteur es van comprar a Sigma-Aldrich. L' H_2O bidestil·lada emprada es realitzava amb un sistema de destil·lació contínua tradicional. Els enzims recombinants solubles es van adquirir a R&D Systems i els substrats fluorogènics a Thermo-Fisher Scientific i Sigma.

M.2. Instrumentació

La quantificació de proteïnes per BCA es va dur a terme en un lector automàtic de plaques Spectramax M5 de Bionova Científica. Les electroforesis es van realitzar amb la cel·la electroforètica Mini-PROTEAN II Electrophoresis Cell de BioRad. Les transferències dels Western Blot de proteïnes aïllades es van realitzar amb el sistema Mini Trans-Blot[®] Cell de BioRad i el revelat per quimioluminescència es va fer amb un aparell Fujifilm LAS4000Mini biomolecular imager. Les espectrometries de masses MALDI-TOF es van enregistrar amb un aparell Autoflex III Smartbeam de Bruker Daltonics.

Durant l'estada a Toulouse es va emprar un incubador de CO₂ de la casa Binder pel creixement cel·lular. La centrifugació de cèl·lules es va dur a terme en una Ultracentrífuga Beckman i la centrifugació de subfraccions cel·lulars en una ultramicrocentrífuga Beckman. L'assaig de desplaçament es va realitzar en un aparell Packard Liquid Scintillation Spectrophotometric Counter. Les electroforesis es van dur a terme amb el sistema Mini-PROTEAN[®] Tetra Cell de BioRad i la transferència a la membrana en el Western Blot es va realitzar amb l'equip Trans-Blot[®] SD Semi-Dry Transfer Cell de BioRad.

TLC, Les cromatografies en capa fina (CCF) es van realitzar sobre cromatofolis de sílica gel 60F₂₅₄ de Merck de 20x20 cm amb un gruix de 0,2mm. Les cromatografies en columna es van realitzar amb sílica flash de 60Å (35-70 µm) de SDS.

Per la purificació de *building blocks* glicosilats es va emprar el sistema de MPLC automàtic Isolera Biotage Prime emprant cartutxos SNAP KP-Sil de 50 g de sílica. Per la purificació de pèptids es va emprar el sistema *Versaflash*[™] en fase reversa emprant cartutxos de fase reversa de C₁₈ de 70 g de la casa Supelco.

La caracterització per cromatografia líquida d'alta resolució, HPLC-RP analítica, es va realitzar en un equip Merck Hitachi equipat amb una columna de fase reversa LiChroCART® (4x250 mm) amb farciment LiChrospher® RP-18 100 Å (5µm). La cromatografia líquida de ultra resolució acoblada a espectrometria de masses d'alta resolució UPLC-HRMS(ESI/TOF) es va realitzar en un sistema UPLC Acquity de Waters amb una columna Acquity UPLC (2,1x100 mm) amb farciment BEH C₁₈ 130 Å (1,7 µm), acoblat a un equip de masses amb ionització per electrospray i detecció per temps de vol ESI/TOF model LCT Premier de Waters. Com a masa de referència dels espectres de masses d'alta resolució, s'ha emprat la de la Leu-encefalina. La caracterització per espectroscopia de ressonància magnètica nuclear (NMR) es va realitzar amb un aparell Varian VNMRs 400 amb una sonda OneNMR™ autosintonizable amb el sistema ProTune (¹H 400MHz i ¹³C 100MHz). S'hi van realitzar experiments de ¹H i ¹³C, així com experiments 2D de espectroscòpia de correlació homonuclear de protó (¹H-COSY) i de espectroscòpia de correlació de simple quantum protó-carboni (HSQC ¹H-¹³C) per assignar cada senyal. Com a dissolvents deuterats es van emprar CDCl₃ i MeOD-d₄.

Per l'anàlisi elemental realitzat pel servei de microanàlisi de l'IQAC es va emprar un Microanalitzador Elemental Thermo Finnigan Flash 1112 que permet la determinació de C, H, N mitjançant el mètode de Pregl-Dumas (Dynamic Flash Combustion).

La ultramicrobalança de precisió Mettler M5 es va emprar per quantificar les mostres peptídiques per realitzar-ne estudis *in vitro*.

Durant l'estada a l'Institut Pasteur es va utilitzar un lector de microplaques per fluorescència amb monocromador Tecan model infinite 200.

M.3. Metodologia

M.3.1. Receptor Opioides

M.3.1.1. Assajos de proteòmica

M.3.1.1.1. Electroforesi

Les electroforesis de proteïnes es van realitzar amb condicions desnaturalitzants amb el mètode de Laemmli^[127]. Es van emprar mini gels de SDS-PAGE de 9 x 7 cm a la cel·la electroforètica Mini-protean II (BioRad). Els gels es van preparar a partir de una solució concentrada d'acrilamida al 30% (p/v) i bisacrilamida al 0,3% (p/v). A la fase separadora es van utilitzar concentracions finals de poliacrilamida entre el 6 i el 12%, afegint a la solució concentrada inicial Tris-HCl 1,5M (pH 8,8), SDS 10% (p/v), persulfat d'amoni (APS) 10% (p/v), H₂O MilliQ per ajustar la concentració i TEMED com a iniciador de la polimerització. Es va cobrir la part superior amb una capa de EtOH per evitar el contacte amb l'aire i es va deixar polimeritzar durant 30 min abans d'eliminar l'EtOH. A la fase de càrrega es va utilitzar una concentració final de poliacrilamida al 5%, afegint a la solució concentrada inicial Tris-HCl 1M (pH 6,8), SDS 10% (p/v), APS 10% (p/v), H₂O MilliQ per ajustar la concentració i TEMED. Es va tancar el sistema amb la pinta marcadora i es va deixar polimeritzar el gel durant 20 min.

Les mostres es van diluir amb el tampó de càrrega (Tris-HCl 0,3M (pH 6,8), glicerol 8% (v/v), SDS 1,6% (p/v), β-mercaptoetanol 4% (v/v) i blau de bromofenol 0,08% (v/v) i es van aplicar als pous del gel. Al primer pou de cada gel s'hi va carregar el marcador de pes molecular PageRuler™ Protein Ladder (Thermoscientific).

L'electroforesi es va dur a terme col·locant la cel·la electroforètica connectada a l'alimentació en una cubeta amb tampó (Tris base 1,5%

(p/v), glicina 7% (p/v), SDS 0,5% (p/v) en H₂O MilliQ. Es va aplicar un voltatge de 120 V durant 1-2 h.

M.3.1.1.2. Tinció amb Coomassie G

Finalitzada l'electroforesi, es va realitzar la fixació de la proteïna al gel incubant-lo en una solució d'EtOH al 50% (v/v) i AcOH al 7% (v/v) a durant 30 min. A continuació es van rentar els gels dos vegades amb H₂O MilliQ i es va realitzar la tinció amb una suspensió de blau brillant de Coomassie G-250 en MeOH 20% (v/v) durant 2 h. Finalment, es va realitzar un primer pas d'eliminació del soroll de fons amb una solució de MeOH 25% (v/v) i AcOH 10% (v/v) durant 1 h i es va completar amb una altra solució de MeOH al 25% (v/v) tota la nit. Els gels es van guardar a temperatura ambient en H₂O MilliQ o PBS fins a la seva utilització.

M.3.1.1.3. Digestions trípriques en gel

Es van retallar les bandes desitjades del gel amb bisturí i es van col·locar en vials de polipropilè (Eppendorf Protein Lobind). Es van rentar amb H₂O MilliQ i es van deshidratar amb una solució d'EtOH al 50% (v/v) i NH₄HCO₃ 25 mM durant 15 min i amb EtOH durant 15 min més. Es va realitzar un tractament reductor amb una solució de DTT 10 mM en NH₄HCO₃ 50 mM a 56°C durant 1 h i alquilant amb una solució de iodoacetamida (IAA) 55 mM en NH₄HCO₃ 50 mM en fosc, a temperatura ambient durant 30 min. Es van tornar a deshidratar les bandes, aquesta vegada amb una solució de ACN al 50% (v/v) i NH₄HCO₃ 25 mM durant 10 min, fent dos repeticions i amb ACN durant 10 min més. Es van deixar assecar les restes de dissolvent i es va afegir la tripsina en concentració 1:30 respecte a la proteïna present a la banda diluïda en 15 µL de NH₄HCO₃ 25 mM. Es va incubar a 30°C durant tota la nit, o a 37°C durant 4 o 20 h. Es va aturar la digestió

afegint 10 µL d'ACN a 37°C durant 15 min i els pèptids digerits es van extreure del gel afegint una solució de TFA al 0,2% (v/v), incubant a temperatura ambient durant 30 min i amb un bany d'ultrasons durant 2 min. Les solucions peptídiques es van transvasar a vials nets de polipropilè.

M.3.1.1.4. Digestions quimotríptiques en gel

Es va utilitzar el procediment descrit a l'apartat M.3.1.1.4 per retallar les bandes desitjades del gel, realitzar-ne el tractament reductor, alquilant i de deshidratació. Es va afegir la quimotripsina en concentració 1:15 respecte a la proteïna present a la banda diluïda en un tampó de Tris 100 mM (pH 8,0) i CaCl_2 10 mM. Es va incubar a 30°C durant tota la nit, o a 37°C durant 2, 4 o 20 h. Es va aturar la digestió afegint 10 µL d'ACN a 37°C durant 15 min i els pèptids digerits es van extreure del gel afegint una solució de TFA al 0,2% (v/v), incubant-ho a temperatura ambient durant 30 min i sonicant la solució 2 min més. Les solucions peptídiques es van transvasar a vials nets de polipropilè i es van guardar a -20°C fins a la seva anàlisi.

M.3.1.1.5. Digestions tríptiques en solució

Es va afegir 10 µL de Tris-HCl 100mM (pH 8,0) sobre 4 µL de mostra amb una concentració de 2 g/mL de proteïna. Es va realitzar un tractament reductor amb DTT 5 mM a 56°C durant 30 min i alquilant amb IAA 15 mM a temperatura ambient durant 15 min en absència de llum. La reacció es va aturar afegint 1 µL de DTT 50 mM a temperatura ambient durant 10 min. Les mostres es van separar en alíquotes en 4 vials de propilè per fer-ne les digestions. Es van afegir 15 µL de solució de tripsina (en concentració 1:30 respecte la proteïna) amb un tampó de NH_4HCO_3 25 mM. Es va incubar a 30°C durant tota la nit, o a 37°C durant 2, 4 o 20 h. Les digestions es van aturar baixant el pH amb 1 µL

TFA al 20% (v/v) i escalfant-les a 37°C durant 30 min. Les solucions peptídiques es van guardar a -20°C fins al seu anàlisi.

M.3.1.1.6. Digestions quimotríptiques en solució

Es va utilitzar el procediment descrit a l'apartat M.3.1.1.6 per preparar la mostra proteïca, realitzar-ne el tractament reductor, alquilant i de separació d'alíquotes. Es van afegir 15 µL de solució de quimotripsina (en concentració 1:20 respecte la proteïna) amb un tampó de 100 mM de Tris-HCl (pH 8,0) i 10 mM de CaCl₂. Es van incubar a 30°C 4 o 20 h, o a 37°C durant 2 o 20 h. Les digestions es van aturar baixant el pH amb 1 µL TFA al 20% (v/v) i escalfant-les a 37°C durant 30 min. Les solucions peptídiques es van guardar a -20°C fins a la seva anàlisi.

M.3.1.1.7. EM MALDI-TOF

- Preparació de mostres digerides

Les mostres digerides en gel es van utilitzar directament, mentre que les mostres digerides en solució van necessitar un pas de dessalat i concentració per ZipTip®.

Per dur a terme la concentració, es va acondicionar una punta ZipTip® de C₁₈ amb 10 µL d'ACN, es va equilibrar amb una solució de TFA del 0,1% (v/v) en H₂O MilliQ i els pèptids es van unir a la matriu de C₁₈ realitzant 10 cicles d'aspiració de tot el volum de la mostra. Les sals presents es van rentar amb una solució de TFA del 0,1% (v/v) en H₂O MilliQ i els pèptids es van eluir amb 2 µL d'una solució de ACN al 70% (v/v) i TFA al 0,1% (v/v).

Les mostres es van carregar a una placa Standard MTP384 target plate polished steel T F (Care-Bruker). Es van dipositar 0,5-2 µL d'una alíquota del digerit i, immediatament, se li van afegir 0,5µL de solució de matriu (procedent d'un stock de DHB 10 mg/mL en ACN al 50% (v/v) en

H₂O MilliQ). Es van mesclar ambdues solucions amb la punta de la pipeta i es van deixar assecar i cristal·litzar a l'aire.

- EM MALDI-TOF i processament de les dades

Els espectres de masses es van mesurar en mode de reflectró positiu. Es van acumular 100-1000 espectres per mostra. Es va utilitzar com a patró calibrant una solució de angiotensina II (1045 Da) i substància P (1346 Da). Les dades es van processar amb el software flexAnalysis (Bruker-Daltonics) per establir el llistat de pics, realitzar-ne una calibració estadística i eliminar els valors corresponents a contaminants (pèptids de la l'autòlisi de tripsina o de la digestió de queratina humana). Es va utilitzar el programa Biotools (Bruker-Daltonics) per comparar els pics obtinguts amb les masses esperades de la digestió teòrica i l'aplicació Mascot (Bruker-Daltonics) per comparar-los amb digestions proteiques de les bases de dades Swiss-Prot i NCBI nr.

M.3.1.2. Posada a punt de la metodologia de iodació de proteïnes

Es van realitzar assajos de iodació i anàlisis de les reaccions per EM amb les següents proteïnes: BSA comercial, quimotripsinogen i lisozim C.

M.3.1.2.1. Reacció de Iodació de proteïnes model

Es van preparar 4 vials amb diferents quantitats de IPy₂BF₄ (0,5, 1, 5 i 10 eq. respecte a les Tyr de la proteïna) dissolt en CH₂Cl₂. Les solucions es van evaporar sota corrent de N₂ en absència de llum, fins a formar una pel·lícula a les parets dels vials. Es van afegir 100 µL de BSA de concentració 2 mg/mL en H₂O MilliQ a cada vial i es van incubar amb agitació durant 10 min. El cru de reacció es va analitzar per EM MALDI-TOF. També es va realitzar una digestió en solució del cru per analitzar les posicions iodades dins de la seqüència.

M.3.1.2.2. EM MALDI-TOF sobre proteïnes íntegres

- Preparació de mostres

Els crús de reacció es van dessalar per ZipTip® de C₄. Es va acondicionar una punta ZipTip® de C₄ amb 10 µL d'ACN, es va equilibrar amb una solució de TFA del 0,1% (v/v) en H₂O MilliQ i la proteïna es va unir a la matriu de C₄ realitzant 10 cicles d'aspiració utilitzant 5 µL del cru. Les sals presents es van rentar amb una solució de TFA del 0,1% (v/v) en H₂O MilliQ i la proteïna es va eluir amb 2 µL d'una solució de ACN al 50% (v/v) i TFA al 0,1% (v/v).

Les mostres es van carregar a una placa Standard MTP384 target plate polished steel T F (Care-Bruker). Es van dipositar 2 µL d'una alíquota de proteïna i, immediatament, se li van afegir 0,5 µL de solució de matriu (SA 10 mg/mL en ACN al 50% (v/v) i TFA al 0,05% (v/v) en H₂O MilliQ). Es van mesclar ambdues solucions amb la punta de la pipeta i es van deixar assecar i cristal·litzar a l'aire.

- EM MALDI-TOF i processament de les dades

Els espectres de masses es van mesurar en mode lineal positiu. Es van acumular 100-1000 espectres per mostra. Les dades es van processar amb el software flexAnalysis (Bruker-Daltonics).

M.3.1.2.3. Digestions enzimàtiques de proteïnes iodades

Es va realitzar una digestió en solució sobre 5 µL del cru de reacció de iodació, seguint el mateix protocol que als apartats M.3.1.1.5. i M.3.1.1.6.

M.3.1.2.5. EM MALDI-TOF sobre proteïnes iodades prèviament digerides

Les mostres iodades i digerides es van dessalar amb ZipTip® de C₁₈, carregar en polished steel amb matriu de DHB i analitzar per MALDI-TOF seguint el protocol de l'apartat M.3.1.1.7.

M.3.1.3. Obtenció del receptor opioide

Durant l'estada al laboratori del CNRS de Toulouse, es va treballar per amplificar les diferents línies cel·lulars disponibles establement transfectades amb el receptor opioide, comprovar el nivell de transfecció disponible i realitzar la lisi de les cèl·lules per aïllar el receptor i realitzar experiments de proteòmica més endavant. Es va treballar amb dos tipus de cèl·lules amb diferents transfeccions, totes elles de mamífer i amb una expressió demostrada del receptor ancorat a la membrana. La soca de cèl·lules CHO (d'ovari de hamster xinès) portava una transfecció estable del μ OR amb Myc i His-tag, mentre que la soca de cèl·lules SHSY-5Y (neuroblastoma humana) incloïa la transfecció del μ OR amb T7-tag.

M.3.1.3.1. Creixement i ampliació del cultiu

Les soques seleccionades es van plantar en plaques de Petri de 150 mm de diàmetre amb medi de cultiu Ham's F12 Nutrient Mixture amb un 7 % de sèrum fetal boví, 2 mM de L-Glutamina, 1 mM de piruvat sòdic i 100 u/mL d'higromicina per mantenir la selecció de les cèl·lules recombinants. Aquestes van créixer adherides a la placa amb incubació a 37°C i un 5% de CO₂. Es van realitzar canvis de medi de cultiu fresc cada 24 h, fins a aconseguir un 90-100% de confluència (2-3 dies), cosa que es va comprovar per microscopi, moment en el que es van desancorar de la placa mitjançant una solució de 0,1% de tripsina i 0,53 mM de EDTA per dividir-les i passar-les a noves plaques amb medi de cultiu fresc, amplificant així el cultiu.

M.3.1.3.2. Homogenat de membranes

Per realitzar l'aïllament del receptor transfectat es va partir de 15 plaques de cèl·lules de la mateixa soca amb una confluència del 90-100%, aquestes es van desancorar mitjançant una solució de 0,1% de tripsina i 0,53 mM de EDTA.

Les cèl·lules es van centrifugar a 1000 g durant 15 min a 4°C i es va aspirar el sobrenedant. A continuació, es van ultracongelar durant 2 h a -80°C. Les cèl·lules ultracongelades es van resuspendre en 1 mL de tampó Tris-HCl (pH 7,4) a 0°C i es van extrudir en un homogeneïtzador de teixits de tipus Potter-Elvehjem. Els orgànuls cel·lulars es van separar per centrifugació a 1000g durant 15 min a 4°C i la fracció de membranes es va sedimentar mitjançant la ultracentrifugació del sobrenedant a 50000 rpm durant 35 min a 4°C. Aquestes es van guardar a -80°C fins a ser utilitzades.

Partint de l'homogenat de membranes de cada placa, es va comprovar el seu nivell de transfecció. Aquesta comprovació es va realitzar mitjançant un assaig de desplaçament de lligand calent i, simultàniament, per Western Blot.

M.3.1.3.3. Avaluació de la concentració de RO per assaig d'unió a lligand radioactiu

Es van resuspendre 3 alíquotes de 1 µg d'homogenats de membrana dels diferents clons en 500 µL de tampó 50mM Tris-HCl pH 7,4 i 0,1% de BSA a 0°C. Dos dels duplicats es van incubar durant 1h a 25°C amb 50 µL de solucions entre 0,05 i 3 nM de [³H]diprenorfina de 50 Ci/mmol, mentre que el blanc es va incubar amb 100 µL d'una barreja equimolar de [³H]diprenorfina i [¹H]diprenorfina amb les mateixes concentracions. Les mostres es van filtrar amb filtres Whatman GF/B preincubats en polietilenimina al 0,3% i es van rentar 3 vegades amb un tampó 10 mM

Tris-HCl pH 7,4 i 0,1% de BSA. Es van col·locar els filtres en líquid de centelleig durant 3 h i es va mesurar la radioactivitat present a les mostres amb un comptador espectrofotomètric de centelleig líquid Packard. Les dades obtingudes es van analitzar amb el software Prism (GraphPad). Els homogenats amb un nivell de transfecció inferior a l'habitual (10 pmol/mg proteïna) es van descartar.

M.3.1.3.4. Detecció dels RO per Western Blot d'homogenats de membrana

A partir alíquotes de 2 µL dels homogenats de membrana dels diferents clons, es va realitzar la solubilització, desnaturalització i reducció de les proteïnes amb SDS i DTT. Es va realitzar una electroforesi amb les alíquotes sobre un gel de poliacrilamida al 12% a 180 V i 280 mA durant 55 min. Es va acondicionar la membrana de PVDF per rentants amb MeOH, H₂O i tampó de transferència (glicina 192 mM, Tris base 25 mM i 20% MeOH). La transferència es va realitzar mitjançant el mètode *semi-wet* a 15 V i 1,12 A durant 20 min entre dues capes de cel·lulosa. Per evitar interaccions inespecífiques dels anticossos, es va bloquejar la membrana amb una solució de llet descremada en pols al 5% en H₂O durant tota la nit a 4°C. Es va rentar amb PBST i es va incubar en una solució amb un anticòs primari (ratolí anti-Myc-tag en PBST) durant 1h a temperatura ambient. Es va rentar abundantment amb PBST i es va incubar en un anticòs secundari (HRP anti-ratolí). Es va tornar a rentar de manera repetida amb PBST i, finalment, amb PBS. La membrana es va impregnar amb un kit revelador amb base de luminol Amersham ECL Prime (GE Healthcare Life Sciences) i es va revelar en plaques fotogràfiques a la cambra fosca amb diferents temps d'exposició entre 1 segon i 15 min.

M.3.1.3.5. Aïllament del RO per cromatografia d'afinitat

Es van ajuntar els homogenats de les 12 plaques obtingudes amb transfecció adequada de hμOR-Myc-His (10 pmol/mg proteïna) i es van solubilitzar en el tampó de solubilització (100mM NaH₂PO₄, 10mM Tris-HCl, 20mM β-mercaptoethanol, 0,1% SDS i 8M urea, pH 8) agitant durant 1 h a temperatura ambient. Es va carregar la mostra en una columna d'afinitat de Ni. Es van eluir diferents fraccions amb el tampó de 100mM NaH₂PO₄, 10mM Tris-HCl, 0,1% SDS i diferents concentracions d'imidazole (0-300 mM). Es va comprovar el contingut de cada fracció per electroforesis en SDS-PAGE i es va seleccionar la fracció corresponent a 100 mM d'imidazole. A partir d'aquí, el procediment realitzat va continuar al laboratori de Barcelona.

M.3.1.3.6. Quantificació de la proteïna per l'assaig de BCA a mostres de RO aïllat

Per quantificar el receptor aïllat a la mostra, en mostres amb una concentració de 0,1 a 2 mg/mL, es va realitzar el test de quantificació de proteïnes Pierce Micro BCA Protein Assay Kit (Thermoscientific) seguint el protocol descrit al kit. Es van preparar sobre microplaca transparent diferents pous amb 20 μL de solució de BSA de referència en dilucions de 2 mg/mL fins a 0,03 mg/mL amb H₂O MilliQ per establir la línia de calibratge o 20 μL de la mostra a quantificar en dilucions de 1/4 a 1/256. Es va afegir a cada pou 100 μL de la mescla de reactius del kit, consistent en un tampó de tartrat/carbonat, àcid bicinconínic i sulfat de coure. Es va deixar reaccionar a 37°C durant 30 min. L'avanç de la reacció colorimètrica es va quantificar per absorbància a 562 nm en un lector automàtic de plaques.

Per quantificar mostres a una dilució més baixa, amb concentracions de 5 a 200 μg/mL, es va utilitzar un mètode alternatiu. Es van preparar

sobre microplaca transparent diferents pous amb 100 µL de solució de BSA de referència en dilucions de 200 µg/mL fins a 3 µg/mL amb H₂O MilliQ per establir la línia de calibratge o 100 µL de la mostra a quantificar en dilucions de 1 a 1/64. Es van afegir a cada pou 100 µL de la mescla de reactius del kit i es va deixar reaccionar a 37°C durant 2 h. L'avanç de la reacció colorimètrica es va quantificar per absorbància a 562 nm en un lector automàtic de plaques.

Les dades per establir la línia de calibratge, validar-la i quantificar la mostra es van processar amb el programa Excel (Microsoft).

M.3.1.4. Proteòmica sobre el receptor opioide

M.3.1.4.1. Concentració de mostra

Les mostres amb receptor rebudes de Toulouse després de la cromatografia d'afinitat es van concentrar amb 3 metodologies diferents:

- a) Per evaporació en SpeedVac es va reduir el volum de mostra de 50 mL a 2 mL.
- b) Per centrifugació amb un filtre de diàlisi Centricon Amicon Millipore de 3 KDa es va reduir el volum de mostra de 10 mL a 1,5 mL mantenint la quantitat de proteïna i sense concentrar les sals del tampó, centrifugant a 4000g a 4°C durant 20 min.
- c) Per precipitació de la proteïna afegint un 90% d'acetona tota la nit a -20°C. Es va decantar el sobrenedant i es va redissoldre en un volum 6 vegades inferior de tampó 100 mM de Tris-HCl (pH 7,8) i 2M d'urea en H₂O MilliQ. Aquest mètode permet eliminar el SDS present a la mostra original.

M.3.1.4.2. Western Blot del receptor aïllat

Es va realitzar una electroforesi amb alíquotes de 0,5 µg del receptor, sobre un gel de poliacrilamida al 10% a 100V durant 150 min. Es va preparar la membrana de PVDF rentant-la amb MeOH, H₂O i tampó de transferència. La transferència es va realitzar mitjançant el mètode *wet* a 100 V durant 60 min entre dues capes de cel·lulosa dins un bany de tampó de transferència a 0°C. Per evitar interaccions inespecífiques dels anticossos, es va bloquejar la membrana amb una solució de llet descremada en pols al 5% en H₂O durant 1h a temperatura ambient. Es va rentar amb TBST i es va incubar en una solució amb l'anticòs primari (ratolí anti-Hys-tag en TBST) tota la nit a 4°C. Es va rentar abundantment amb TBST i es va incubar en l'anticòs secundari (HRP anti-ratolí). Es va tornar a rentar de manera abundant amb TBST i, finalment, amb PBS. La membrana es va impregnar amb el kit revelador amb base de luminol Amersham ECL Plus Western Blotting Detection System i se'n va detectar la quimioluminescència utilitzant l'aparell Fujifilm LAS4000Mini biomolecular imager.

M.3.1.4.3. Digestions enzimàtiques del RO

Sobre les mostres de receptor purificades i concentrades, es va realitzar una electroforesi carregant alíquotes de entre 1 i 8 µg de receptor en gels del 10% de poliacrilamida. Posteriorment, es van realitzar tincions amb Coomassie Brilliant Blue G-250 i es van retallar les bandes obtingudes a l'altura de 50KDa. Aquestes bandes es van digerir en gel seguint el procediment de l'apartat M.3.1.1.3.

Simultàniament, es van realitzar digestions en solució seguint el mateix protocol que als apartats M.3.1.1.5. i M.3.1.1.6., sobre alíquotes de 50 µL de mostra purificada abans i després de ser concentrades.

M.3.1.4.4. EM MALDI-TOF del RO digerit

Les mostres digerides, tant en gel com en solució, es van analitzar per MALDI-TOF seguint el mateix protocol de l'apartat M.3.1.1.7.

M.3.1.5. Assajos de iodació sobre cèl·lules

Es va partir de 4 plaques de 15 cm de diàmetre de cèl·lules de la mateixa soca amb una confluència del 90-100%, amb una concentració aproximada de 10 mg de proteïna per placa. Es van rentar abundantment amb PBS per eliminar el medi de cultiu. Es van dissoldre 6 mg de IPy_2BF_4 en 4 mL de DMSO. La solució es va diluir en 36 mL de PBS i es va repartir ràpidament entre les plaques. Es va deixar reaccionar amb agitació orbital en absència de llum durant 5 min. Les cèl·lules es van desancorar de les plaques amb procediment mecànic i es van ajuntar en un vial de polipropilè Falcon.

Les cèl·lules es van centrifugar a 1000 g durant 15 min a 4°C per separar-les del sobrenedant. A continuació, es van ultracongelar durant 2 h a -80°C. Els pellets ultracongelats es van resuspendre en 1 mL de tampó Tris-HCl (pH 7,4) a 0°C i es van extrudir en un homogeneïtzador de teixits Potter-Elvehjem. Els orgànuls cel·lulars es van separar per centrifugació a 1000g durant 15 min a 4°C i la fracció de membranes es va sedimentar mitjançant la ultracentrifugació del sobrenedant a 50000 rpm durant 35 min a 4°C. Aquestes es van guardar a -80°C fins a ser utilitzades.

Es va realitzar una electroforesis i Western Blot d'una alíquota de les membranes seguint el procediment descrit a l'apartat M.3.1.3.4. utilitzant pel seu revelat com a anticossos primaris ratolí anti-Myc-tag o ratolí anti-Hys-tag.

M.3.2. Lligands del receptor opioide

M.3.2.1. Mètodes general s

M.3.2.1.1. Síntesi de pèptids Manual en fase sòlida

Els pèptids es van sintetitzar manualment en un flascó de síntesi de pèptids amb placa filtrant seguint la metodologia estàndard en fase sòlida amb protocols Fmoc amb resines tipus Wang o tipus Rink Amida, emprant aminoàcids que contenen grups protectors ortogonals a les cadenes laterals i amb les condicions indicades en aquest procediment general a menys que s'especifiqui el contrari.

En primer lloc es va realitzar la desprotecció del grup Fmoc de les respectives resines amb una solució de piperidina en DMF al 20% (v/v) amb agitació orbital durant 10 min. L'acoblament dels aminoàcids a les respectives resines es va realitzar per tractament de la resina amb l'extrem *N*-terminal lliure amb l'agent d'acoblament DIC (3 eq.), el reactiu HOBt (6 eq.) i l'aminoàcid corresponent en DMF amb agitació orbital a temperatura ambient entre 2 i 20 h. La reacció es va monitoritzar segons el test de Kaiser (apartat M.3.2.1.2). Per acoblaments difícils, es va tractar amb el reactiu d'acoblament PyBOP (3 eq.), en presència de DIEA (6 eq.) com a base i l'aminoàcid corresponent amb agitació orbital a temperatura ambient entre 3 h i tota la nit, monitorant amb el test de Kaiser. L'aparició de color blau a la resina és indicatiu d'amines primàries lliures i, per tant, d'acoblaments incomplets. Finalitzat l'acoblament, es va realitzar un pas de *capping* amb AcOH (5 eq.) i DIPEA (10 eq.) en CH₂Cl₂ amb agitació puntual durant 15 min. El procediment es va repetir iterativament fins a incorporar tots els aminoàcids de la seqüència. Es va seguir una tàctica el màxim de convergent possible, separant en alíquotes les resines

amb aminoàcids ja incorporats per sintetitzar diferents pèptids amb extrems C-terminals comuns.

La desprotecció dels grups protectors de les cadenes laterals i el desancorament del pèptid de la resina es va dur a terme amb una barreja de TFA/H₂O/TIS (95:2,5:2,5) a temperatura ambient durant 2 h. Es va recollir el filtrat, es va rentar la resina repetidament amb la barreja anterior, es van reunir els filtrats i es van evaporar gairebé a sequetat sota corrent de N₂.

M.3.2.1.2. Test de Kaiser

El test de Kaiser^[89] es va realitzar sobre una petita alíquota de resina per assegurar l'absència d'amines primàries lliures i, per tant, la finalització de cada acoblament. Sobre l'alíquota es van afegir 2 gotes de cadascuna d'aquestes solucions: 1 g de ninhidrina dissolta en 10 mL d'EtOH, 80 g de fenol dissolts en 20 mL d'EtOH i 100 mL de piridina. El tub d'assaig es va escalfar a 100°C en un bany d'H₂O durant 3 min.

M.3.2.1.3. Purificació dels pèptids i determinacions analítiques

El cru resultant de la síntesi es va triturar en ^tBuOMe fred 2 vegades i es va analitzar per HPLC analítica en fase reversa (C₁₈ RP-HPLC). En el cas de glicopèptids es va realitzar un altre pas de desprotecció dels acetils de la part glicosídica dissolent el pèptid en MeOH anhidre i afegint lentament MeONa 0,5M en MeOH anhidre fins a un pH 7,5 en la reacció. L'avanç de la reacció de desprotecció es va comprovar per RP-HPLC i, un cop finalitzada, es va neutralitzar la solució amb AcOH fins a pH 5.

A continuació, es va procedir a la seva purificació per columna de C₁₈ en fase reversa amb el sistema *Versaflash*TM amb un gradient determinat de H₂O/ACN, el seguiment de les fraccions eluïdes de la columna es va realitzar mitjançant assajos de ninhidrina i toolidina sobre CCF. La puresa

i identitat dels pèptids finals es va comprovar per HPLC analítica en fase reversa (C₁₈ RP-HPLC) i UPLC-HRMS(ESI/TOF) i se'n va quantificar el contingut peptídic per anàlisi elemental mesurant el percentatge de nitrogen al servei de microanàlisi de l'IQAC (CSIC).

M.3.2.1.4. Assaig de Ninhidrina i Tolidina sobre CCF

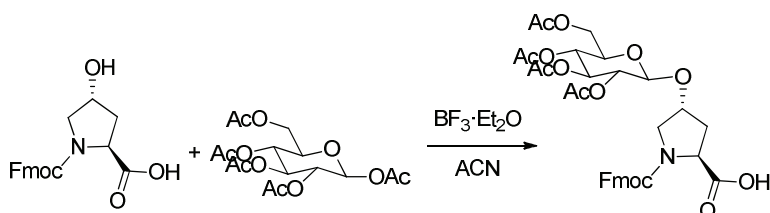
Una petita alíquota de cada fracció eluida per *Versaflash*TM es va carregar sobre una placa de CCF de gel de sílice sobre alumini. Per detectar quines fraccions contenien pèptids es van realitzar 2 assajos sobre la placa:

El primer va ser el test de ninhidrina. La placa es va ruixar amb un esprai amb solució de AcOH 0,1M i ninhidrina al 0,5% (p/v) en ⁿBuOH i es va escalfar sobre una placa calefactora. La presència de pèptids es va comprovar per detecció de grups amino lliures, obtenint coloració rosada en fraccions concentrades.

Un altre test que es va aplicar és el del clor i *o*-tolidina. Tots els compostos amb grups funcionals NH poden ser detectats per conversió a compostos *N*-clorats i reacció amb *o*-tolidina. Amb aquest reactiu es poden detectar els grups amida dels pèptids llargs. Per realitzar-lo es fa servir la mateixa placa revelada amb ninhidrina. Es va col·locar la placa en una cambra saturada de Cl₂ (g) (el gas s'obté per la reacció entre de HCl 2M i KMnO₄) fins a la seva destinció i *N*-cloració de les amides. Es va assecar uns minuts a l'aire per desorbir l'excés de Cl₂. Seguidament es va ruixar amb un esprai amb solució de tolidina al 0,1% (p/v), AcOH al 3% (v/v) i KI al 0,5% (p/v) en H₂O i es va escalfar sobre una placa calefactora. La presència d'amides va donar lloc a una coloració ataronjada que ressaltava sobre el fons que es va tornar verd en escalfar.

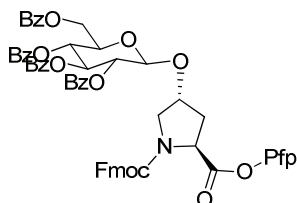
M.3.2.2. Síntesi de glicosilaminoàcids protegits

M.3.2.2.1. Síntesi de Fmoc-(Glc(OAc)₄)Hyp-OH



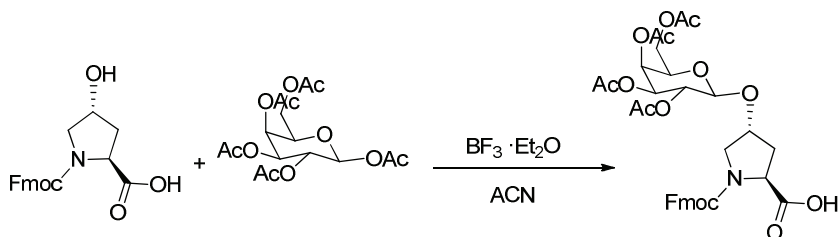
En condicions anhidres i sota atmosfera d'argó es va preparar una suspensió de Fmoc-hidroxiprolina (555 mg, 1,57 mmol) en ACN. S'hi va afegir una solució de glucosa peracetilada (495 mg, 1,26 mmol) en ACN, es va refredar a 0°C i es van addicionar gota a gota 3 eq. de BF₃·Et₂O (475 µL, 4,71 mmol). Es va deixar agitant suaument recuperant la temperatura ambient i se'n va realitzar un seguiment per RP-HPLC de l'avanç de reacció. Al cap de 36 h, es va abocar sobre 150 mL de gel i se'n va extreure el producte amb CH₂Cl₂. El cru obtingut va consistir en una mescla de difícil separació de producte de partida : producte monoglicosilat : producte diglicosilat (1:4:1). Caracterització: RP-HPLC C₁₈ analítica (De (50:50) (0,1%TFA en ACN: 0,1%TFA en H₂O) a (90:10) (0,1%TFA en ACN: 0,1%TFA en H₂O) en 25 min, t.r.: 4,1 min (16%), 7,2 min (66%), 9,2 min (18%)). UPLC-HRMS(ESI/TOF): massa no localitzada ([M+H]⁺, C₃₄H₃₈NO₁₄⁺; calc. 684,2214). MALDI-TOF: [M+Na] 706,43, [M+K] 722,42, [M+GlcOAc (diglicosilat)] 1036.75.

M.3.2.2.2. Caracterització completa de Fmoc-(Glc(OBz)₄)Hyp-OPfp



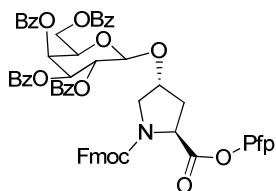
Per la síntesi de pèptids, es va emprar aquest building block Fmoc-(Glc(OBz)₄)Hyp-OPfp, sintetitzat anteriorment al grup. La seva caracterització va correspondre a una mescla 1:1 entre el producte activat amb pentafluorofenol (Pfp) i el seu corresponent àcid. Caracterització de la mescla: RP-HPLC analítica (De (50:50) (0,1%TFA en MeOH: 0,1%TFA en H₂O) a (100:0) ((0,1%TFA en MeOH: 0,1%TFA en H₂O)) en 30 min, t.r.: 25 min (40%), 29 min (47%)). UPLC-HRMS(ESI/TOF): massa no localitzada ([M+H]⁺, C₆₀H₄₅NO₁₄F₅⁺; calc. 1098,2682). MALDI-TOF: [M+Na] 1120,75, [M+Na-Pfp] 954,69. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.91 – 7.66 (m, 8H, C_{ar}H Bz), 7.68 – 7.65 (m, 2H, C_{ar}H Fmoc), 7.50 – 7.16 (m, 18H, C_{ar}H Fmoc, C_{ar}H Bz), 5.86 (m, 1H, C₃H), 5.62 (m, 1H, C₄H), 5.47 (m, 1H, C₂H), 4.92 (m, 1H, C₁H), 4.60 – 4.27 (m, 6H, C₆H, C_αH, C_γH, C_δH, CH₂ Fmoc), 4.10 (m, 2H, C₅H, CH Fmoc), 3.77 (C_δH₂), 2.39 (m, 1H, C_βH), 2.20 (m, 1H, C_βH). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 165.95-165.15 (C_q Bz), 143.85 (C_qFmoc), 141.42 (C_qFmoc), 133.59 - 129.80 (C_{ar}H Bz), 129.11 – 120.09 (C_{ar}H Fmoc), 100.64 (C₁H), 77.35 (C_αH), 72.83 (C₅H), 72.78 (C₃H), 71.87 (C₂H), 71.02 (C₄H), 69.67(CH₂ Fmoc), 63.14 (C₆H₂), 57.39 (C_γH), 52.84 (C_δH₂), 47.15 (CH Fmoc), 35.97 (C_βH₂).

M.3.2.2.3. Síntesi de Fmoc-(Gal(OAc)₄)Hyp-OH



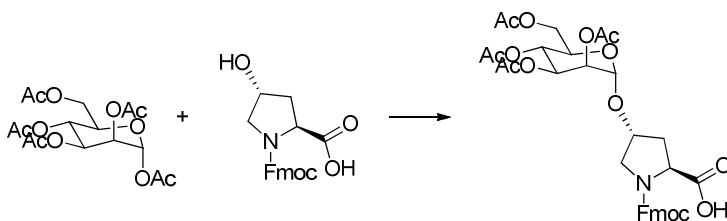
En condicions anhidres i sota atmosfera d'argó es va preparar una suspensió de Fmoc-hidroxirolina (555 mg, 1,57 mmol) en ACN. S'hi afegeix una solució de galactosa peracetilada (495 mg, 1,26 mmol) en ACN, es va refredar a 0°C i s'hi va afegir gota a gota 3 equivalents de $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ (475 μL , 4,71 mmol). Es va deixar agitant suaument recuperant la temperatura ambient i es va realitzar el seguiment de la reacció per RP-HPLC. Al cap de 36h, es va abocar sobre 150 mL de gel i es va extreure el producte amb CH_2Cl_2 . El cru obtingut va consistir en una mescla de difícil separació de producte de partida : producte monoglicosilat : producte diglicosilat (1:7:2). Caracterització del cru: RP-HPLC analítica (De (50:50) (0,1%TFA en MeOH: 0,1%TFA en H_2O) a (90:10) (0,1%TFA en MeOH: 0,1%TFA en H_2O) en 25 min, t.r.: 3,8 min (9%), 6,7 min (76%), 8,2 min (24%). UPLC-HRMS(ESI/TOF): 684,2220 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, $\text{C}_{34}\text{H}_{38}\text{NO}_{14}^+$; calc. 684,2214). MALDI-TOF: $[\text{M}+\text{Na}]$ 706,43, $[\text{M}+\text{GalOAc (diglicosilat)}]$ 1036.73. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.78 – 7.27 (m, 8H, $\text{C}_{\text{ar}}\text{H}$ Fmoc), 5.40 (m, 1H, C_4H), 5.18 (m, 1H, C_2H), 5.02 (m, 1H, C_3H), 4.54 (d, 1H, C_1H), 4.50 – 4.26 (m, 6H, C_αH , C_γH , CH_2 Fmoc, CH Fmoc), 4.41 (m, 2H, C_6H_2), 3.91 (m, 1H, C_5H), 3.73 (C_8H_2), 2.32 (m, 1H, C_βH), 2.05 (m, 1H, C_βH), 2.14 (s, 3H, Ac), 2.07 (s, 3H, Ac), 2.01 (s, 3H, Ac), 1.99 (s, 3H, COCH_3). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 174.58 – 143.69 (C_q , $\text{C}_\text{q}\text{Fmoc}$), 141,43 (C_q COCH_3), 127.97 – 120.20 ($\text{C}_{\text{ar}}\text{H}$ Fmoc), 100.50 (C_1H), 76.90 (C_αH), 71.05 (C_5H), 70.93 (C_3H), 68.78 (C_2H), 68.45 (CH_2 Fmoc), 67.04 (C_4H), 61.31 (C_6H_2), 57.90 (C_γH), 52.69 (C_8H_2), 47.22 (CH Fmoc), 34.76 (C_βH_2), 20.386 – 20.70 (COCH_3).

M.3.2.2.4. Caracterització completa de Fmoc-(Gal(OBz)₄)Hyp-OPfp.



Per la síntesi de pèptids, es va emprar aquest building block Fmoc-(Gal(OBz)₄)Hyp-OPfp, sintetitzat anteriorment al grup. Caracterització: RP-HPLC analítica (De (50:50) (0,1%TFA en MeOH: 0,1%TFA en H₂O) a (100:0) (0,1%TFA en MeOH: 0,1%TFA en H₂O) en 30 min, t.r.: 21 min. UPLC-HRMS(ESI/TOF): (1098,2793 [M+H]⁺, C₆₀H₄₅NO₁₄F₅⁺; calc. 1098,2682; 1120.2576 [M+Na], C₆₀H₄₄NO₁₄F₅Na⁺; calc. 1120,2574). MALDI-TOF: [M+Na] 1120.21. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.10 – 7.23 (m, 28H, C_{ar}H Bz, C_{ar}H Fmoc), 6.01 (m, 1H, C₄H), 5.79 (m, 1H, C₂H), 5.64 (m, 1H, C₃H), 4.92 (m, 1H, C₁H), 4.65 – 4.21 (m, 7H, C₆H, C_αH, C_γH, C₆H, CH₂ Fmoc, C₅H), 4.09 (m, 1H, CH Fmoc), 3.88 – 3.75 (C_δH₂), 2.50 (m, 1H, C_βH), 2.33 (m, 1H, C_βH). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 172.54 – 140.26 (C_q Bz, C_qFmoc), 132.64 – 128.71 (C_{ar}H Bz), 127.99 – 118.95 (C_{ar}H Fmoc), 99.88 (C₁H), 76.20 (C_αH), 70.63 (C₅H), 70.52 (C₃H), 68.53 (C₂H), 67.37 (CH₂ Fmoc), 67.01 (C₄H), 60.98 (C₆H₂), 56.75 (C_γH), 51.66 (C_δH₂), 46.02 (CH Fmoc), 33.48 (C_βH₂).

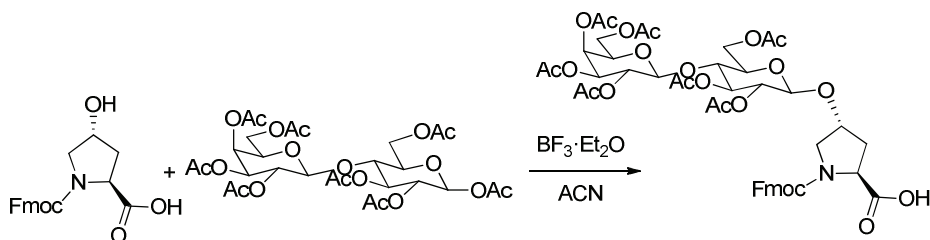
M.3.2.2.5. Síntesi de Fmoc-(Man(OAc)₄)Hyp-OH



En condicions anhidres i sota atmosfera d'argó es va preparar una suspensió de Fmoc-hidroxiprolina (543 mg, 1,54 mmol) en CH₂Cl₂. S'hi va afegir una solució de mannanosa peracetilada (512 mg, 1,31 mmol) en

CH₂Cl₂, es va refredar a 0°C i s'hi van afegir gota a gota 9 eq. de BF₃·Et₂O (1,4 mL, 14,1 mmol). Es va deixar agitant suaument fins recuperar la temperatura ambient i es va realitzar el seguiment de la reacció per RP-HPLC. Al cap de 18h, es va abocar sobre 150 mL de gel i es va extreure el producte amb CH₂Cl₂. Seguidament, es va aïllar per cromatografia en columna amb el sistema de MPLC Biotage®, emprant cartutxos SNAP KP-Sil de Silica. Caracterització: RP-HPLC analítica (De (50:50) (0,1%TFA en MeOH: 0,1%TFA en H₂O) a (100:0) (0,1%TFA en MeOH: 0,1%TFA en H₂O) en 30 min, t.r.: 20 min. HRMS: [M+H] 684.22754, [M+Na] 706.2059. MALDI-TOF: [M+H] 685.7169, [M+16] 699.2956, [M+Na] 706.4768, ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.77 – 7.34 (m, 8H, C_{ar}H Fmoc), 5.56 (m, 1H, C₃H), 5.28 (m, 1H, C₂H), 5.22 (t, 1H, C₄H), 4.43 (2s, 1H, C₁H), 4.43 - 4.27 (m, 4H C_γH, C_αH, CH₂ Fmoc), 4.28 (m, 1H, C₆H), 4.09 (m, 1H, C₆H), 3.99 (m, 1H, CH Fmoc), 3.78 (m, 1H, C₅H), 3.61 (dd, 2H, C_δH₂), 2.48 (m, 1H, C_βH), 2.39 (m, 1H, C_βH), 2.22 – 1.97 (s, 4x3H, COCH₃). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 170.66 – 141.28 (C_q, COCH₃, C_qFmoc), 127.78 – 120.00 (C_{ar}H Fmoc), 97.42&96.6 (C₁H), 75.94 (C_αH), 74.12 (C₃H), 71.58 (C₅H), 69.56 – 65.15 (C₄H, C₂H, CH Fmoc, CH₂ Fmoc) 62.18 (C₆H₂), 58.02 (C_γH), 51.47 (C_δH₂), 23.26 (C_βH₂), 20.85 – 20.47 (COCH₃).

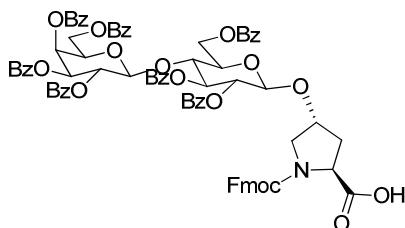
M.3.2.2.6. Síntesi de Fmoc-(Lac(OAc)₇)Hyp-OH



En condicions anhidres i sota atmosfera d'argó es va preparar una suspensió de Fmoc-hidroxiprolina (551 mg, 1,56 mmol) en ACN. S'hi va afegir una solució de Lactosa peracetilada (882 mg, 1,3 mmol) en ACN,

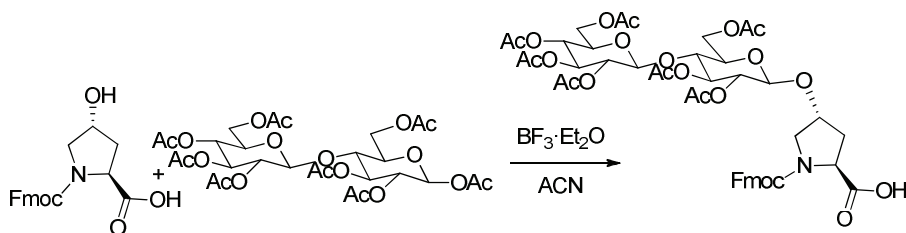
es va refredar a 0°C i s'hi van afegir gota a gota 3 eq. de $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ (480 μL , 3,9 mmol). Es va deixar agitant suaument fins recuperar la temperatura ambient i es va realitzar el seguiment de la reacció per RP-HPLC. Al cap de 96 h, es va abocar sobre 150 mL de gel i es va extreure el producte amb CH_2Cl_2 . El cru obtingut va consistir en una mescla de producte de partida : producte monoglicosilat : producte diglicosilat (1:1:2) que es va separar per cromatografia en columna de silica flash amb un gradient CH_2Cl_2 :MeOH:AcOH de 99:0:1 a 94,5:4,5:1; obtenint 719 mg (57% rendiment) d'un sòlid blanc caracteritzat com a Fmoc-(Lac(OAc)₇)Hyp-OH. Caracterització: RP-HPLC analítica (De (50:50) (0,1%TFA en MeOH: 0,1%TFA en H₂O) a (100:0) (0,1%TFA en MeOH: 0,1%TFA en H₂O) en 30 min, t.r.: 23 min. HRMS: [M+H] 972.3148, [M+Na] 994.2990. MALDI-TOF: [M+Na] 994.7086. ¹H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.77 – 7.28 (m, 8H, C_{ar}H Fmoc), 5.39 – 4.83 (m, 5H, C₂H, C₃H, C₄H, C₃H, C₂H), 4.61 – 4.25 (m, 8H, C₁H, C₁H, C_aH, C_yH, C₆H₂, CH₂ Fmoc), 4.16 – 4.04 (m, 3H, CH Fmoc, C₆H₂), 3.87 – 3.57 (m, 5H, C₅H, C₄H, C₅H₂, C₅H), 2.31 (m, 1H, C_βH), 2.13 (m, 1H, C_βH), 2.15 – 1.96 (s, 7x3H, COCH₃). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 176.82 – 141.37 (C_q, COCH₃, C_qFmoc), 127.92 – 120.16 (C_{ar}H Fmoc), 101.18 (C₁H), 99.56 (C₁H), 77.36 (C_aH), 76.19 (C₄H), 72.81 – 66.69 (C₅H, C₃H, C₅H, C₂H, C₃H, C₄H, CH₂ Fmoc), 61.93 (C₂H), 60.89 (C₆H₂, C₆H₂), 57.79 (C_yH), 52.61 (C₅H₂), 47.15 (CH Fmoc), 34.88 (C_βH₂), 20.92 – 20.65 (COCH₃).

M.3.2.2.7. Caracterització completa de Fmoc-(Lac(OBz)₇)Hyp-OH



Per la síntesi de pèptids, es va emprar aquest building block Fmoc-(Gal(OBz)₇)Hyp-OPfp, sintetitzat anteriorment al grup. Caracterització: ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.90 – 7.13 (m, 43H, CH Bz, C_{ar}H Fmoc), 5.75 (m, 1H, C₃H), 5.66 (m, 2H, C₂H, C₄H), 5.39 (m, 1H, C₂H), 5.33 (m, 1H, C₃H), 4.81 (m, 1H, C₁H), 4.74 (m, 1H, C₁H), 4.54 – 4.43 (m, 4H, C_αH, C_γH, C₆H₂), 4.20 (m, 3H, C₄H, CH₂ Fmoc), 4.03 (m, 1H, CH Fmoc), 3.80 – 3.65 (m, 6H, C₅H, C₅H, C_δH₂, C₆H₂), 2.30 (m, 1H, C_βH), 2.15 (m, 1H, C_βH). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 168.21 – 141.21 (C_q, C_q Bz, C_qFmoc), 133.38 – 119.89 (CHBz, C_{ar}H Fmoc), 101.02 (C₁H), 100.37 (C₁H), 77.19 (C_αH), 75.87 (C₄H), 73.44 – 67.51 (C₃H, C₂H, C₃H, C₄H, C₅H, C₅H, C₂H, CH₂ Fmoc), 62.19 (C₆H₂), 61.03 (C₆H₂), 57.18 (C_γH), 52.57 (C_δH₂), 46.94 (CH Fmoc), 35.77 (C_βH₂).

M.3.2.2.8. Síntesi de Fmoc-(Cel(OAc)₇)Hyp-OH

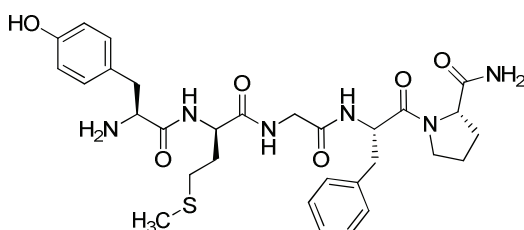


En condicions anhidres i sota atmosfera d'argó es va preparar una suspensió de Fmoc-hidroxiprolina (625 mg, 1,77 mmol) en ACN. S'hi va afegir una solució de cel·lobiosa peracetilada (1000 mg, 1,47 mmol) en ACN, es va refredar a 0°C i s'hi van afegir gota a gota 3 eq. de BF₃·Et₂O (545 µL, 47,41 mmol). Es va deixar agitant suaument fins recuperar la

temperatura ambient i es va realitzar el seguiment de la reacció per RP-HPLC. Al cap de 96 h, es va abocar sobre 150 mL de gel i es va extreure el producte amb CH_2Cl_2 . El cru obtingut va consistir en una mescla de producte de partida : producte monoglicosilat : producte diglicosilat (1:0,3:1) que es va separar per cromatografia en columna amb un gradient CH_2Cl_2 :MeOH:AcOH de 99:0:1 a 94,5:4,5:1; obtenint 724 mg (57% rendiment) d'un sòlid blanc caracteritzat com a Fmoc-(Cel(OAc)₇)Hyp-OH. Caracterització: RP-HPLC analítica (De (50:50) (0,1%TFA en MeOH: 0,1%TFA en H₂O) a (100:0) (0,1%TFA en MeOH: 0,1%TFA en H₂O) en 30 min, t.r.: 23 min. HRMS: [M+H] 972.3120, [M+18] 989.3384, [M+Na] 994.2938, [M+K] 1010.3014. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.78 – 7.26 (m, 8H, C_{ar}H Fmoc), 5.17 – 5.06 (m, 3H, C₃H, C₄H, C₂H), 4.91 (m, 2H, C₂H, C₃H), 5.02 (m, 1H, C₃H), 4.64 – 4.24 (m, 8H, C₁H, C₁H, C_αH, C_γH, C₆H₂, CH₂ Fmoc), 4.16 – 3.97 (m, 3H, CH Fmoc, C₆H₂), 3.87 – 3.54 (m, 5H, C₄H, C₈H₂, C₅H, C₅H), 2.28 (m, 1H, C_βH), 2.10 (m, 1H, C_βH), 2.12 – 1.97 (s, 7x3H, COCH₃). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 176.63 – 141.35 (C_q, COCH₃, C_qFmoc), 127.91 – 120.15 (C_{ar}H Fmoc), 100.87 (C₁H), 99.62 (C₁H), 76.380 (C_αH), 72.98 – 71.37 (C₄H, C₃H, C₄H, C₂H, C₃H, C₅H, C₅H), 68.31 (C₂H), 67.82 (CH₂ Fmoc), 61.63 (C₆H₂, C₆H₂), 57.77 (C_γH), 52.63 (C₈H₂), 47.14 (CH Fmoc), 34.91 (C_βH₂), 20.90 – 20.66 (COCH₃).

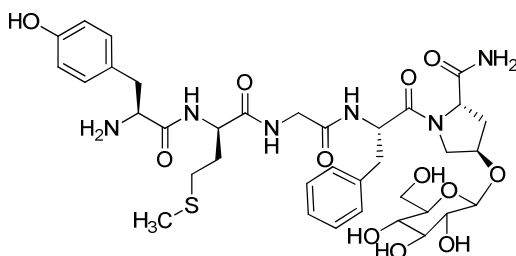
M.3.2.3. Síntesi dels O-glicopèptids i del pèptid patró

M.3.2.3.1. Síntesi i caracterització de [D-Met²,Pro⁵]encefalinamida



El pèptid [D-Met²,Pro⁵]encefalinamida (H-Tyr-D-Met-Gly-Phe-Pro-NH₂) es va sintetitzar a partir de 300 mg de la resina Fmoc-Rink Amida (de substitució: 0,56 mmol/g resina) emprant els següents aminoàcids protegits: Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-D-Met-OH i Fmoc-Tyr(^tBu)-OH. El cru es va purificar per RP-HPLC preparativa amb el sistema *Versaflash*TM (De (5:95) (ACN:H₂O) a (50:50) (ACN:H₂O) en 50 min amb un cartutx de RP de C₁₈) per obtenir 46 mg d'un sòlid blanc caracteritzat com a [D-Met²,Pro⁵]encefalinamida. Caracterització: RP-HPLC analítica (de (20:80) (0,1%TFA en ACN: 0,1%TFA en H₂O) a (80:20) (0,1%TFA en ACN: 0,1%TFA en H₂O) en 25 min, t.r.: 10,64 min). UPLC-HRMS(ESI/TOF): 613,2832 ([M+H]⁺, C₃₀H₄₁N₆O₆S⁺; calc. 613,2808).

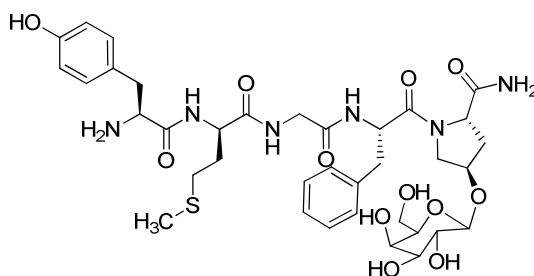
M.3.2.3.2. Síntesi i caracterització de [D-Met²,(Glc)Hyp⁵]encefalinamida



El pèptid [D-Met²,(Glc)Hyp⁵]encefalinamida (H-Tyr-D-Met-Gly-Phe-(Glc)Hyp-NH₂) es va sintetitzar a partir de 115 mg de la resina Fmoc-Rink Amida (de substitució: 0,56 mmol/g resina) emprant els següents

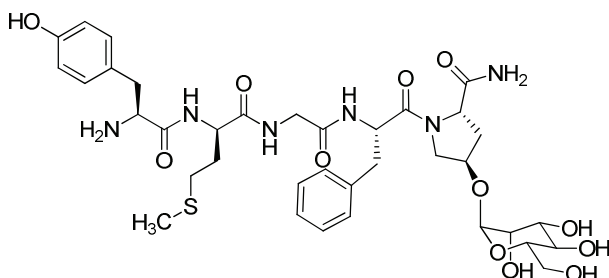
aminoàcids protegits: Fmoc-(Glc(OBz)₄)Hyp-OPfp, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-D-Met-OH i Fmoc-Tyr(^tBu)-OH. La part sacarídica es va desprotegir en medi bàsic amb MeONa en MeOH anhidre. El cru es va purificar per RP-HPLC preparativa amb el sistema *Versaflash*TM (De (5:95) (ACN:H₂O) a (50:50) (ACN:H₂O) en 50 min amb un cartutx de RP de C₁₈) per obtenir 32 mg d'un sòlid blanc caracteritzat com a [D-Met²,(Glc)Hyp⁵]encefalinamida. Caracterització: RP-HPLC analítica (De (20:80) (0,1%TFA en ACN: 0,1%TFA en H₂O) a (80:20) (0,1%TFA en ACN: 0,1%TFA en H₂O) en 25 min, t.r.: 7,57 min). UPLC-HRMS(ESI/TOF): 791,3311 ([M+H]⁺, C₃₆H₅₁N₆O₁₂S⁺; calc. 791,3286).

M.3.2.3.3. Síntesi i caracterització de [D-Met²,(Gal)Hyp⁵]encefalinamida



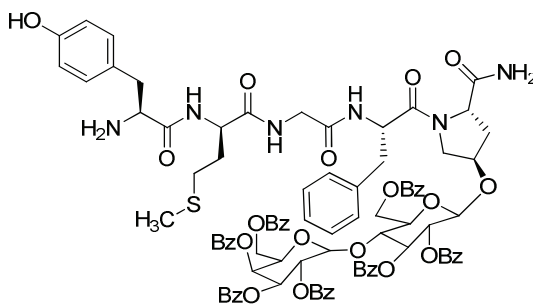
El pèptid [D-Met²,(Gal)Hyp⁵]encefalinamida (H-Tyr-D-Met-Gly-Phe-(Gal)Hyp-NH₂) es va sintetitzar a partir de 115 mg de la resina Fmoc-Rink Amida (de substitució: 0,56 mmol/g resina) emprant els següents aminoàcids protegits: Fmoc-(Gal(OBz)₄)Hyp-OPfp, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-D-Met-OH i Fmoc-Tyr(^tBu)-OH. La part sacarídica es va desprotegir en medi bàsic amb MeONa en MeOH anhidre. El cru es va purificar per RP-HPLC preparativa amb el sistema *Versaflash*TM (De (5:95) (ACN:H₂O) a (50:50) (ACN:H₂O) en 50 min amb un cartutx de RP de C₁₈) per obtenir 27 mg d'un sòlid blanc caracteritzat com a [D-Met²,(Gal)Hyp⁵]encefalinamida. Caracterització: RP-HPLC analítica (De (20:80) (0,1%TFA en ACN: 0,1%TFA en H₂O) a (80:20) (0,1%TFA en ACN: 0,1%TFA en H₂O) en 25 min, t.r.: 7,63 min). UPLC-HRMS(ESI/TOF): 791,3309 ([M+H]⁺, C₃₆H₅₁N₆O₁₂S⁺; calc. 791,3286).

M.3.2.3.4. Síntesi i caracterització de [D-Met²,(Man)Hyp⁵]encefalinamida



El pèptid [D-Met²,(Gal)Hyp⁵]encefalinamida (H-Tyr-D-Met-Gly-Phe-(Man)Hyp-NH₂) es va sintetitzar a partir de 115 mg de la resina Fmoc-Rink Amida (de substitució: 0,56 mmol/g resina) emprant els següents aminoàcids protegits: Fmoc-(Man(OAc)₄)Hyp-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-D-Met-OH i Fmoc-Tyr(^tBu)-OH. La part sacarídica es va desprotegir en medi bàsic amb MeONa en MeOH anhidre. El cru es va purificar per RP-HPLC preparativa amb el sistema *Versaflash*TM (De (5:95) (ACN:H₂O) a (50:50) (ACN:H₂O) en 50 min amb un cartutx de RP de C₁₈) per obtenir 25 mg d'un sòlid ataronjat caracteritzat com a [D-Met²,(Man)Hyp⁵]encefalinamida. Caracterització: RP-HPLC analítica (De (20:80) (0,1%TFA en ACN: 0,1%TFA en H₂O) a (80:20) (0,1%TFA en ACN: 0,1%TFA en H₂O) en 25 min, t.r.: 7,57 min). UPLC-HRMS(ESI/TOF): 791,3329 ([M+H]⁺, C₃₆H₅₁N₆O₁₂S⁺; calc. 791,3286).

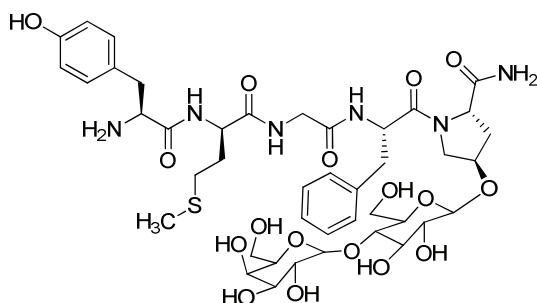
M.3.2.3.5. Intent de síntesi i desprotecció de [D-Met²,(Lac)Hyp⁵]encefalinamida



El pèptid [D-Met²,(Lac(Obz)₇)Hyp⁵]encefalinamida (H-Tyr-D-Met-Gly-Phe-(Lac(Obz)₇)Hyp-NH₂) es va sintetitzar a partir de 100 mg de la

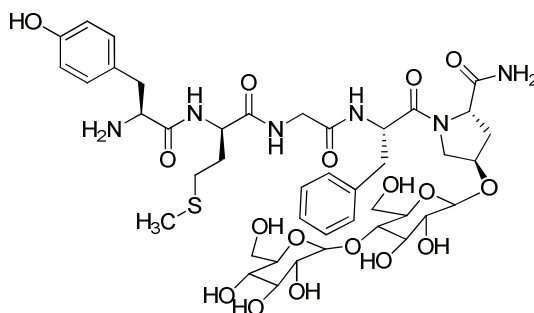
resina Fmoc-Rink Amida (de substitució: 0,56 mmol/g resina) emprant els següents aminoàcids protegits: Fmoc-(Lac(OBz)₇)Hyp-OPfp, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-D-Met-OH i Fmoc-Tyr(^tBu)-OH. La part sacarídica es va intentar desprotegir sense èxit en medi bàsic amb MeONa en MeOH anhidre. Es va obtenir una mescla de compostos parcialment desprotegits i degradats difícil de separar.

M.3.2.3.6. Síntesi i caracterització de [D-Met²,(Lac)Hyp⁵]encefalinamida



El pèptid [D-Met²,(Lac)Hyp⁵]encefalinamida (H-Tyr-D-Met-Gly-Phe-(Lac)Hyp-NH₂) es va sintetitzar a partir de 100 mg de la resina Fmoc-Rink Amida (de substitució: 0,56 mmol/g resina) emprant els següents aminoàcids protegits: Fmoc-(Lac(OAc)₇)Hyp-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-D-Met-OH i Fmoc-Tyr(^tBu)-OH. La part sacarídica es va desprotegir en medi bàsic amb MeONa en MeOH anhidre. El cru es va purificar per RP-HPLC preparativa amb el sistema *Versaflash*TM (De (5:95) (ACN:H₂O) a (50:50) (ACN:H₂O) en 50 min amb un cartutx de RP de C₁₈) per obtenir 11 mg d'un sòlid blanc caracteritzat com a [D-Met²,(Lac)Hyp⁵]encefalinamida. Caracterització: RP-HPLC analítica (De (20:80) (0,1%TFA en ACN: 0,1%TFA en H₂O) a (80:20) (0,1%TFA en ACN: 0,1%TFA en H₂O) en 25 min, t.r.: 5,39 min). UPLC-HRMS(ESI/TOF): 953,3818 ([M+H]⁺, C₄₂H₆₁N₆O₁₇S⁺; calc. 953,3814).

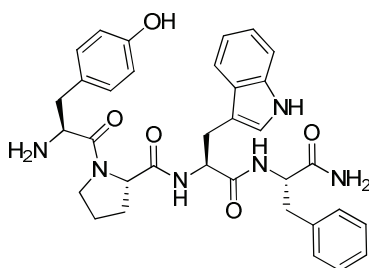
M.3.2.3.7. Síntesi i caracterització de [D-Met², (Cel)Hyp⁵]encefalinamida



El pèptid [D-Met², (Cel)Hyp⁵]encefalinamida (H-Tyr-D-Met-Gly-Phe-(Cel)Hyp-NH₂) es va sintetitzar a partir de 115 mg de la resina Fmoc-Rink Amida (de substitució: 0,56 mmol/g resina) emprant els següents aminoàcids protegits: Fmoc-(Cel(OAc)₇)Hyp-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-D-Met-OH i Fmoc-Tyr(^tBu)-OH. La part sacarídica es va desprotegir en medi bàsic amb MeONa en MeOH anhidre. El cru es va purificar per RP-HPLC preparativa amb el sistema *Versaflash*TM (De (5:95) (ACN:H₂O) a (50:50) (ACN:H₂O) en 50 min amb un cartutx de RP de C₁₈) per obtenir 7 mg d'un sòlid blanc caracteritzat com a [D-Met², (Lac)Hyp⁵]encefalinamida. Caracterització: RP-HPLC analítica (De (20:80) (0,1%TFA en ACN: 0,1%TFA en H₂O) a (80:20) (0,1%TFA en ACN: 0,1%TFA en H₂O) en 25 min, t.r.: 5,32 min). UPLC-HRMS(ESI/TOF): 953,3812 ([M+H]⁺, C₄₂H₆₁N₆O₁₇S⁺; calc. 953,3814).

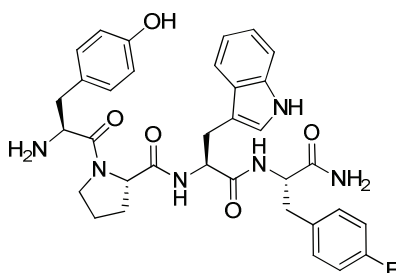
M.3.2.4. Síntesi de pèptids opioïdes halogenats i patrons

M.3.2.4.1. Síntesi i caracterització de endomorfin-1



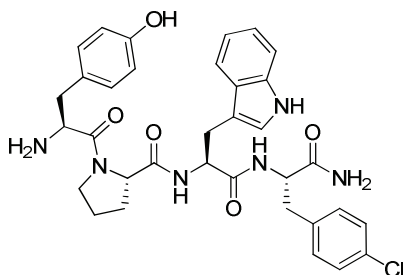
El pèptid endomorfin-1 (H-Tyr-Pro-Trp-Phe-NH₂) es va sintetitzar a partir de 100 mg (0,067 mmol) de la resina Fmoc-Rink Amida (de substitució: 0,61 mmol/g resina) emprant els següents aminoàcids protegits: Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Pro-OH and Fmoc-Tyr(tBu)-OH (4 h). El cru es va purificar per RP-HPLC preparativa amb el sistema *Versaflash*TM (De (20:80) (ACN:H₂O) a (100:0) (ACN:H₂O) en 50 min amb un cartutx de RP de C₁₈) per obtenir 36 mg d'un sòlid blanc caracteritzat com a endomorfin-1. Caracterització: RP-HPLC analítica (De (20:80) (0,1%TFA en ACN: 0,1%TFA en H₂O) a (80:20) (0,1%TFA en ACN: 0,1%TFA en H₂O) en 25 min, t.r.: 12,86 min). UPLC-HRMS(ESI/TOF): 611,2974 ([M+H]⁺, C₃₄H₃₉N₆O₅⁺; calc. 611,2982). Contingut peptídic 76,5% (anàlisi elemental 10,5% N; C₃₄H₃₈N₆O₅ calc. 11,6% N).

M.3.2.4.2. Síntesi i caracterització de [4-F-Phe⁴]endomorfina



El pèptid [4-F-Phe⁴]endomorfina (H-Tyr-Pro-Trp-(4-F)Phe-NH₂) es va sintetitzar a partir de 200 mg (0,122 mmol) de la resina Fmoc-Rink Amida (de substitució: 0,61 mmol/g resina) emprant els següents aminoàcids protegits: Fmoc-(4-F)Phe-OH (2 eq., 20 h), Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Pro-OH and Fmoc-Tyr(tBu)-OH (4 h). El cru es va purificar per RP-HPLC preparativa amb el sistema *Versaflash*TM (De (20:80) (ACN:H₂O) a (100:0) (ACN:H₂O) en 50 min amb un cartutx de RP de C₁₈) per obtenir 56 mg d'un sòlid ataronjat caracteritzat com a [4-F-Phe⁴]endomorfina. Caracterització: RP-HPLC analítica (De (20:80) (0,1%TFA en ACN: 0,1%TFA en H₂O) a (80:20) (0,1%TFA en ACN: 0,1%TFA en H₂O) en 25 min, t.r.: 12,61 min). UPLC-HRMS(ESI/TOF): 629,2869 ([M+H]⁺, C₃₄H₃₈N₆O₅F⁺; calc. 629,2888). Contingut peptídic 83.0% (anàlisi elemental 11,1% N; C₃₄H₃₇N₆O₅F calc. 13,3% N).

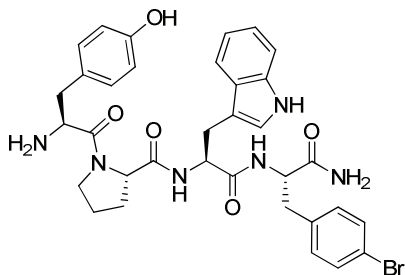
M.3.2.4.3. Síntesi i caracterització de [4-Cl-Phe⁴]endomorfina



El pèptid [4-Cl-Phe⁴]endomorfina (H-Tyr-Pro-Trp-(4-Cl)Phe-NH₂) es va sintetitzar a partir de 300 mg (0,183 mmol) de la resina Fmoc-Rink

Amida (de substitució: 0,61 mmol/g resina) emprant els següents aminoàcids protegits: Fmoc-(4-Cl)Phe-OH (2 eq., 20 h), Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Pro-OH and Fmoc-Tyr(tBu)-OH (4 h). El cru es va purificar per RP-HPLC preparativa amb el sistema *Versaflash*TM (De (20:80) (ACN:H₂O) a (100:0) (ACN:H₂O) en 50 min amb un cartutx de RP de C₁₈) per obtenir 39 mg d'un sòlid groc caracteritzat com a [4-Cl-Phe⁴]endomorfina. Caracterització: RP-HPLC analítica (De (20:80) (0,1%TFA en ACN: 0,1%TFA en H₂O) a (80:20) (0,1%TFA en ACN: 0,1%TFA en H₂O) en 25 min, t.r.: 14,51 min). UPLC-HRMS(ESI/TOF): 645,2601 ([M+H]⁺, C₃₄H₃₈N₆O₅Cl⁺; calc. 645,2592). Contingut peptídic 92.4% (anàlisi elemental 11,0% N; C₃₄H₃₇N₆O₅Cl calc. 11,9% N).

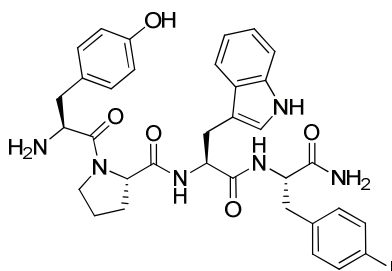
M.3.2.4.4. Síntesi i caracterització de [4-Br-Phe⁴]endomorfina



El pèptid [4-Br-Phe⁴]endomorfina (H-Tyr-Pro-Trp-(4-Br)Phe-NH₂) es va sintetitzar a partir de 200 mg (0,122 mmol) de la resina Fmoc-Rink Amida (de substitució: 0,61 mmol/g resina) emprant els següents aminoàcids protegits: Fmoc-(4-Br)Phe-OH (2 eq., 20 h), Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Pro-OH and Fmoc-Tyr(tBu)-OH (20 h). El cru es va purificar per RP-HPLC preparativa amb el sistema *Versaflash*TM (De (20:80) (ACN:H₂O) a (100:0) (ACN:H₂O) en 50 min amb un cartutx de RP de C₁₈) per obtenir 84 mg d'un sòlid ataronjat caracteritzat com a [4-Br-Phe⁴]endomorfina. Caracterització: RP-HPLC analítica (De (20:80) (0,1%TFA en ACN: 0,1%TFA en H₂O) a (80:20) (0,1%TFA en ACN: 0,1%TFA en H₂O) en 25 min, t.r.: 13,97 min). UPLC-HRMS(ESI/TOF): 689,2084 ([M+H]⁺, C₃₄H₃₈N₆O₅⁷⁹Br⁺; calc. 689,2087), 691,2067 ([M+H]⁺,

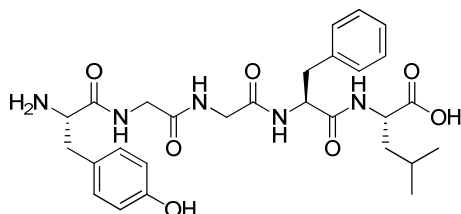
$C_{34}H_{38}N_6O_5^{81}Br^+$; calc. 691,2067). Contingut peptídic 79,6% (anàlisi elemental 9,7% N; $C_{34}H_{37}N_6O_5Br$ calc. 12,2% N).

M.3.2.4.5. Síntesi i caracterització de [4-I-Phe⁴]endomorfina



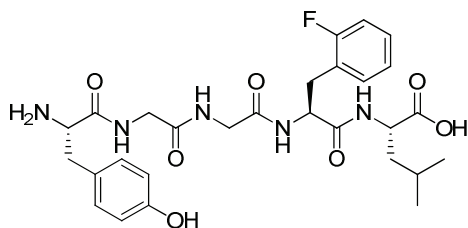
El pèptid [4-I-Phe⁴]endomorfina (H-Tyr-Pro-Trp-(4-I)Phe-NH₂) es va sintetitzar a partir de 200 mg (0,122 mmol) de la resina Fmoc-Rink Amida (de substitució: 0,61 mmol/g resina) emprant els següents aminoàcids protegits: Fmoc-(4-I)Phe-OH (2 eq., 20 h), Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Pro-OH and Fmoc-Tyr(tBu)-OH (20 h). El cru es va purificar per RP-HPLC preparativa amb el sistema *Versaflash*TM (De (20:80) (ACN:H₂O) a (100:0) (ACN:H₂O) en 50 min amb un cartutx de RP de C₁₈) per obtenir 47 mg d'un sòlid groc caracteritzat com a [4-I-Phe⁴]endomorfina. Caracterització: RP-HPLC analítica (De (20:80) (0,1%TFA en ACN: 0,1%TFA en H₂O) a (80:20) (0,1%TFA en ACN: 0,1%TFA en H₂O) en 25 min, t.r.: 14,62 min). UPLC-HRMS(ESI/TOF): 737,1962 ([M+H]⁺, $C_{34}H_{38}N_6O_5I^+$; calc. 737,1948). Contingut peptídic 82,4% (anàlisi elemental 9,4% N; $C_{34}H_{37}N_6O_5I$ calc. 11,4% N).

M.3.2.4.6. Síntesi i caracterització de Leu-encefalina



El pèptid Leu-encefalina (H-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-OH) es va sintetitzar a partir de 120 mg (0,067 mmol) de la resina Fmoc-Leu-WANG (de substitució: 0,61 mmol/g resina) emprant els següents aminoàcids protegits: Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Gly-OH i Fmoc-Tyr(tBu)-OH. El cru es va purificar per RP-HPLC preparativa amb el sistema *Versaflash*TM (De (5:95) (ACN:H₂O) a (50:50) (ACN:H₂O) en 50 min amb un cartutx de RP de C₁₈) per obtenir 30 mg d'un sòlid blanc caracteritzat com a Leu-encefalina. Caracterització: RP-HPLC analítica (De (20:80) (0,1%TFA en ACN: 0,1%TFA en H₂O) a (80:20) (0,1%TFA en ACN: 0,1%TFA en H₂O) en 25 min, t.r.: 11,3 min). UPLC-HRMS(ESI/TOF): 590,2385 ([M+H]⁺, C₂₈H₃₈N₅O₇⁺; calc. 555,2693). Contingut peptídic 76,1% (anàlisi elemental 9,3% N; C₂₈H₃₇N₅O₇ calc. 12,2% N).

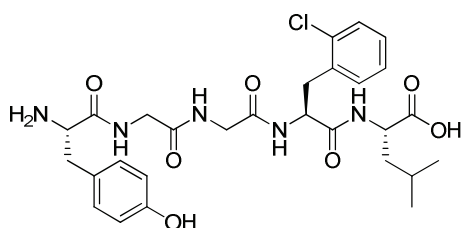
M.3.2.4.7. Síntesi i caracterització de [2-F-Phe⁴]Leu-encefalina



El pèptid [2-F-Phe⁴]Leu-encefalina (H-Tyr-Gly-Gly-(2-F)Phe-Leu-OH) es va sintetitzar a partir de 120 mg (0.087 mmol) de la resina Fmoc-Leu-Wang (de substitució: 0,61 mmol/g resina) emprant els següents aminoàcids protegits: Fmoc-(2-F)Phe-OH (2eq., 20 h), Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Gly-OH i Fmoc-Tyr(tBu)-OH (5 h). El cru es va purificar per RP-

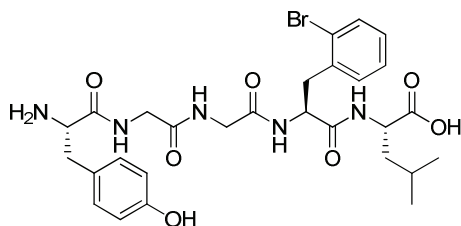
HPLC preparativa amb el sistema *Versaflash*TM (De (5:95) (ACN:H₂O) a (50:50) (ACN:H₂O) en 50 min amb un cartutx de RP de C₁₈) per obtenir 34 mg d'un sòlid blanc caracteritzat com a [2-F-Phe⁴]Leu-encefalina. Caracterització: RP-HPLC analítica (De (20:80) (0,1%TFA en ACN: 0,1%TFA en H₂O) a (80:20) (0,1%TFA en ACN: 0,1%TFA en H₂O) en 25 min, t.r.: 9,7 min). UPLC-HRMS(ESI/TOF): 574,2670 ([M+H]⁺, C₂₈H₃₇N₅O₇F⁺; calc. 574,2677). Contingut peptídic 89,0% (anàlisi elemental 11,2% N; C₂₈H₃₆N₅O₇F calc. 12,6% N).

M.3.2.4.8. Síntesi i caracterització de [2-Cl-Phe⁴]Leu-encefalina



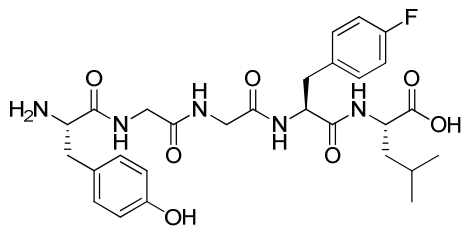
El pèptid [2-Cl-Phe⁴]Leu-encefalina (H-Tyr-Gly-Gly-(2-Cl)Phe-Leu-OH) es va sintetitzar a partir de 120 mg (0.087 mmol) de la resina Fmoc-Leu-Wang (de substitució: 0,61 mmol/g resina) emprant els següents aminoàcids protegits: Fmoc-(2-Cl)Phe-OH (2eq., 20 h), Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Gly-OH i Fmoc-Tyr(tBu)-OH (5 h). El cru es va purificar per RP-HPLC preparativa amb el sistema *Versaflash*TM (De (5:95) (ACN:H₂O) a (50:50) (ACN:H₂O) en 50 min amb un cartutx de RP de C₁₈) per obtenir 30 mg d'un sòlid blanc caracteritzat com a [2-Cl-Phe⁴]Leu-encefalina. Caracterització: RP-HPLC analítica (De (20:80) (0,1%TFA en ACN: 0,1%TFA en H₂O) a (80:20) (0,1%TFA en ACN: 0,1%TFA en H₂O) en 25 min, t.r.: 12,6 min). UPLC-HRMS(ESI/TOF): 590,2385 ([M+H]⁺, C₂₈H₃₇N₅O₇Cl⁺; calc. 590,2382). Contingut peptídic 91,6% (anàlisi elemental 10,9% N; C₂₈H₃₆N₅O₇Cl calc. 11,9% N).

M.3.2.4.9. Síntesi i caracterització de [2-Br-Phe⁴]Leu-encefalina



El pèptid [2-Br-Phe⁴]Leu-encefalina (H-Tyr-Gly-Gly-(2-Br)Phe-Leu-OH) es va sintetitzar a partir de 120 mg (0.087 mmol) de la resina Fmoc-Leu-Wang (de substitució: 0,61 mmol/g resina) emprant els següents aminoàcids protegits: Fmoc-(2-Br)Phe-OH (2 eq., 20 h), Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Gly-OH i Fmoc-Tyr(tBu)-OH (5 h). El cru es va purificar per RP-HPLC preparativa amb el sistema *Versaflash*TM (De (5:95) (ACN:H₂O) a (50:50) (ACN:H₂O) en 50 min amb un cartutx de RP de C₁₈) per obtenir 10 mg d'un sòlid blanc caracteritzat com a [2-Br-Phe⁴]Leu-encefalina. Caracterització: RP-HPLC analítica (De (20:80) (0,1%TFA en ACN: 0,1%TFA en H₂O) a (80:20) (0,1%TFA en ACN: 0,1%TFA en H₂O) en 25 min, t.r.: 11,9 min). UPLC-HRMS(ESI/TOF): 634,1891 ([M+H]⁺, C₂₈H₃₇N₅O₇Br⁺; calc. 634,1849). Contingut peptídic 88,4% (anàlisi elemental 9,8% N; C₂₈H₃₆N₅O₇Br calc. 11,0% N).

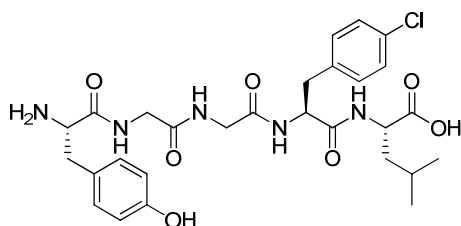
M.3.2.4.10. Síntesi i caracterització de [4-F-Phe⁴]Leu-encefalina



El pèptid [4-F-Phe⁴]Leu-encefalina (H-Tyr-Gly-Gly-(4-F)Phe-Leu-OH) es va sintetitzar a partir de 120 mg (0.087 mmol) de la resina Fmoc-Leu-Wang (de substitució: 0,61 mmol/g resina) emprant els següents aminoàcids protegits: Fmoc-(4-F)Phe-OH (2 eq., 20 h), Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Gly-OH i Fmoc-Tyr(tBu)-OH (5 h). El cru es va purificar per RP-

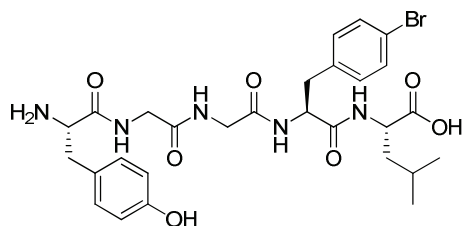
HPLC preparativa amb el sistema *Versaflash*TM (De (5:95) (ACN:H₂O) a (50:50) (ACN:H₂O) en 50 min amb un cartutx de RP de C₁₈) per obtenir 29 mg d'un sòlid blanc caracteritzat com a [4-F-Phe⁴]Leu-encefalina. Caracterització: RP-HPLC analítica (De (20:80) (0,1%TFA en ACN: 0,1%TFA en H₂O) a (80:20) (0,1%TFA en ACN: 0,1%TFA en H₂O) en 25 min, t.r.: 11,8 min). UPLC-HRMS(ESI/TOF): 574,2670 ([M+H]⁺, C₂₈H₃₇N₅O₇F⁺; calc. 574,2677). Contingut peptídic 91,3% (anàlisi elemental 11,5% N; C₂₈H₃₆N₅O₇F calc. 12,6% N).

M.3.2.4.11. Síntesi i caracterització de [4-Cl-Phe⁴]Leu-encefalina



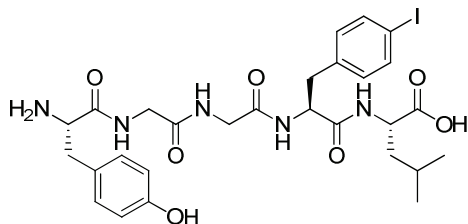
El pèptid [4-Cl-Phe⁴]Leu-encefalina (H-Tyr-Gly-Gly-(4-Cl)Phe-Leu-OH) es va sintetitzar a partir de 120 mg (0.087 mmol) de la resina Fmoc-Leu-Wang (de substitució: 0,61 mmol/g resina) emprant els següents aminoàcids protegits: Fmoc-(4-Cl)Phe-OH (2 eq., 20 h), Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Gly-OH i Fmoc-Tyr(tBu)-OH (5 h). El cru es va purificar per RP-HPLC preparativa amb el sistema *Versaflash*TM (De (5:95) (ACN:H₂O) a (50:50) (ACN:H₂O) en 50 min amb un cartutx de RP de C₁₈) per obtenir 37 mg d'un sòlid blanc caracteritzat com a [4-Cl-Phe⁴]Leu-encefalina. Caracterització: RP-HPLC analítica (De (20:80) (0,1%TFA en ACN: 0,1%TFA en H₂O) a (80:20) (0,1%TFA en ACN: 0,1%TFA en H₂O) en 25 min, t.r.: 12,6 min). UPLC-HRMS(ESI/TOF): 590,2376 ([M+H]⁺, C₂₈H₃₇N₅O₇Cl⁺; calc. 590,2382). Contingut peptídic 92,4% (anàlisi elemental 11,0% N; C₂₈H₃₆N₅O₇Cl calc. 11,9% N).

M.3.2.4.12. Síntesi i caracterització de [4-Br-Phe⁴]Leu-encefalina



El pèptid [4-Br-Phe⁴]Leu-encefalina (H-Tyr-Gly-Gly-(4-Br)Phe-Leu-OH) es va sintetitzar a partir de 120 mg (0.087 mmol) de la resina Fmoc-Leu-Wang (de substitució: 0,61 mmol/g resina) emprant els següents aminoàcids protegits: Fmoc-(4-Br)Phe-OH (2 eq., 20 h), Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Gly-OH i Fmoc-Tyr(tBu)-OH (5 h). El cru es va purificar per RP-HPLC preparativa amb el sistema *Versaflash*TM (De (5:95) (ACN:H₂O) a (50:50) (ACN:H₂O) en 50 min amb un cartutx de RP de C₁₈) per obtenir 40 mg d'un sòlid blanc caracteritzat com a [4-Br-Phe⁴]Leu-encefalina. Caracterització: RP-HPLC analítica (De (20:80) (0,1%TFA en ACN: 0,1%TFA en H₂O) a (80:20) (0,1%TFA en ACN: 0,1%TFA en H₂O) en 25 min, t.r.: 13,2 min). UPLC-HRMS(ESI/TOF): 634,1849 ([M+H]⁺, C₂₈H₃₇N₅O₇Br⁺; calc. 634,1849). Contingut peptídic 91,8% (anàlisi elemental 10,1% N; C₂₈H₃₆N₅O₇Br calc. 11,0% N).

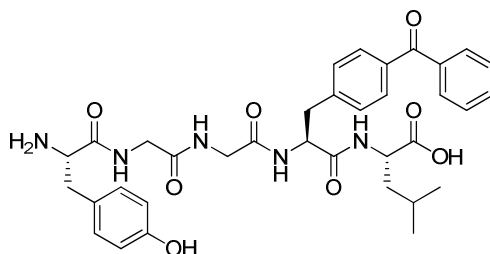
M.3.2.4.13. Síntesi i caracterització de [4-I-Phe⁴]Leu-encefalina



El pèptid [4-I-Phe⁴]Leu-encefalina (H-Tyr-Gly-Gly-(4-I)Phe-Leu-OH) es va sintetitzar a partir de 120 mg (0.087 mmol) de la resina Fmoc-Leu-Wang (de substitució: 0,61 mmol/g resina) emprant els següents aminoàcids protegits: Fmoc-(4-I)Phe-OH (2 eq., 20 h), Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Gly-OH i Fmoc-Tyr(tBu)-OH (5 h). El cru es va purificar per RP-

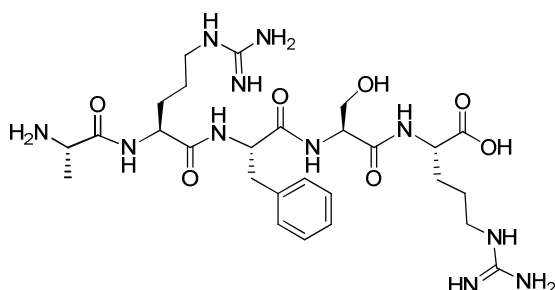
HPLC preparativa amb el sistema *Versaflash*TM (De (5:95) (ACN:H₂O) a (50:50) (ACN:H₂O) en 50 min amb un cartutx de RP de C₁₈) per obtenir 36 mg d'un sòlid blanc caracteritzat com a [4-I-Phe⁴]Leu-encefalina. Caracterització: RP-HPLC analítica (De (20:80) (0,1%TFA en ACN: 0,1%TFA en H₂O) a (80:20) (0,1%TFA en ACN: 0,1%TFA en H₂O) en 25 min, t.r.: 14,4 min). UPLC-HRMS(ESI/TOF): 682.1762 ([M+H]⁺, C₂₈H₃₇N₅O₇I⁺; calc. 682.1762). Contingut peptídic 82,4% (anàlisi elemental 9,4% N; C₂₈H₃₆N₅O₇I calc. 11,4% N).

M.3.2.5.1. Síntesi i caracterització de [Bpa⁴]Leu-encefalina



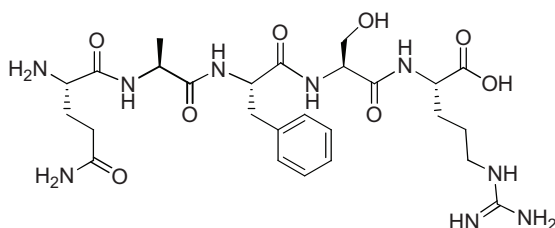
El pèptid [Bpa⁴]Leu-encefalina (H-Tyr-Gly-Gly-Bpa-Leu-OH) es va sintetitzar a partir de 50 mg (0.036 mmol) de la resina Fmoc-Leu-Wang (de substitució: 0,61 mmol/g resina) emprant els següents aminoàcids protegits: Fmoc-Bpa-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Gly-OH i Fmoc-Tyr(tBu)-OH. El cru es va purificar per RP-HPLC preparativa amb el sistema *Versaflash*TM (De (5:95) (ACN:H₂O) a (50:50) (ACN:H₂O) en 50 min amb un cartutx de RP de C₁₈) per obtenir 5 mg d'un sòlid blanc caracteritzat com a [Bpa⁴]Leu-encefalina. Caracterització: RP-HPLC analítica (De (20:80) (0,1%TFA en ACN: 0,1%TFA en H₂O) a (80:20) (0,1%TFA en ACN: 0,1%TFA en H₂O) en 25 min, t.r.: 14,4 min). UPLC-HRMS(ESI/TOF): 660.3029 ([M+H]⁺, C₃₅H₄₂N₅O₈⁺; calc. 660.3033). Contingut peptídic 86,4% (anàlisi elemental 9,2% N; C₂₈H₃₆N₅O₇I calc. 10,6% N).

M.3.3.1.2. Síntesi i caracterització d'[Ala¹]opiorfina



El pèptid [Ala¹]opiorfina (H-Ala-Arg-Phe-Ser-Arg-OH) es va sintetitzar a partir de 119 mg (0,061 mmol) de la resina H-Arg(Pmc)-Phe-Ser(^tBu)-Arg(Pmc)-WANG emprant el següent aminoàcid protegit: Fmoc-Ala-OH. El cru es va purificar per RP-HPLC preparativa amb el sistema *Versaflash*TM (De (0:100) (ACN:H₂O) a (50:50) (ACN:H₂O) en 50 min amb un cartutx de RP de C₁₈) per obtenir 35 mg d'un sòlid blanc caracteritzat com a [Ala¹]opiorfina. Caracterització: RP-HPLC analítica (De (20:80) (0,1%TFA en ACN: 0,1%TFA en H₂O) a (80:20) (0,1%TFA en ACN: 0,1%TFA en H₂O) en 25 min, t.r.: 9,44 min). UPLC-HRMS(ESI/TOF): 636,3586 ([M+H]⁺, C₂₇H₄₆N₁₁O₇⁺; calc. 636,3582).

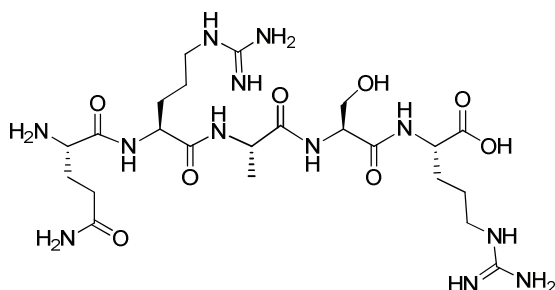
M.3.3.1.3. Síntesi i caracterització d'[Ala²]opiorfina



El pèptid [Ala²]opiorfina (H-Gln-Ala-Phe-Ser-Arg-OH) es va sintetitzar a partir de 97 mg (0,061 mmol) de la resina H-Phe-Ser(^tBu)-Arg(Pmc)-WANG emprant els següents aminoàcids protegits: Fmoc-Ala-OH i Fmoc-Gln(Trt)-OH. El cru es va purificar per RP-HPLC preparativa amb el sistema *Versaflash*TM (De (5:95) (ACN:H₂O) a (50:50) (ACN:H₂O) en

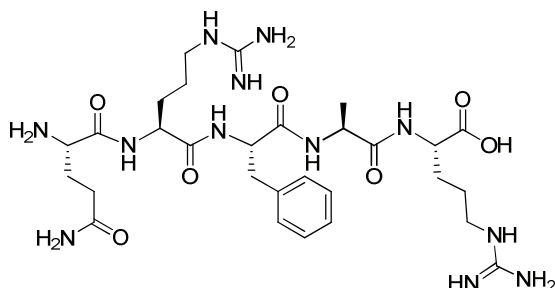
50 min amb un cartutx de RP de C₁₈) per obtenir 17 mg d'un sòlid blanc caracteritzat com a [Ala²]opiorfina. Caracterització: RP-HPLC analítica (10–90% ACN en 30 min, t.r.: 14,59 min). UPLC-HRMS(ESI/TOF): 608,3142 ([M+H]⁺, C₂₆H₄₂N₉O₈⁺; calc. 608,3156).

M.3.3.1.4. Síntesi i caracterització d'[Ala³]opiorfina



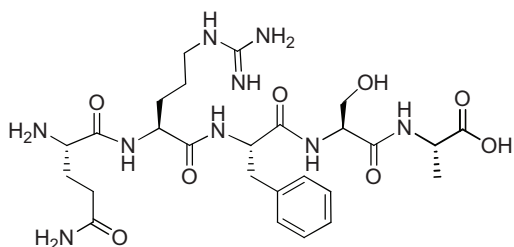
El pèptid [Ala³]opiorfina (H-Gln-Arg-Ala-Ser-Arg-OH) es va sintetitzar a partir de 80 mg (0,061 mmol) de la resina H-Ser(^tBu)-Arg(Pmc)-WANG emprant els següents aminoàcids protegits: Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Arg(Pmc)-OH i Fmoc-Gln(Trt)-OH. El cru es va purificar per RP-HPLC preparativa amb el sistema *Versaflash*TM (De (5:95) (ACN:H₂O) a (50:50) (ACN:H₂O) en 50 min amb un cartutx de RP de C₁₈) per obtenir 26 mg d'un sòlid blanc caracteritzat com a [Ala³]opiorfina. Caracterització: RP-HPLC analítica (De (20:80) (0,1%TFA en ACN: 0,1%TFA en H₂O) a (80:20) (0,1%TFA en ACN: 0,1%TFA en H₂O) en 25 min, t.r.: 2,94 min). UPLC-HRMS(ESI/TOF): 617,3513 ([M+H]⁺, C₂₃H₄₅N₁₂O₈⁺; calc. 617,3483).

M.3.3.1.5. Síntesi i caracterització d'[Ala⁴]opiorfina



El pèptid [Ala⁴]opiorfina (H-Gln-Arg-Phe-Ala-Arg-OH) es va sintetitzar a partir de 75 mg (0,061 mmol) de la resina H- Arg(Pmc)-WANG emprant els següents aminoàcids protegits: Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Arg(Pmc)-OH i Fmoc-Gln(Trt)-OH. El cru es va purificar per RP-HPLC preparativa amb el sistema *Versaflash*TM (De (5:95) (ACN:H₂O) a (50:50) (ACN:H₂O) en 50 min amb un cartutx de RP de C₁₈) per obtenir 33 mg d'un sòlid blanc caracteritzat com a [Ala⁴]opiorfina. Caracterització: RP-HPLC analítica (De (20:80) (0,1%TFA en ACN: 0,1%TFA en H₂O) a (80:20) (0,1%TFA en ACN: 0,1%TFA en H₂O) en 25 min, t.r.: 8,99 min). UPLC-HRMS(ESI/TOF): 677,3813 ([M+H]⁺, C₂₉H₄₈N₁₂O₇⁺; calc. 677,3847).

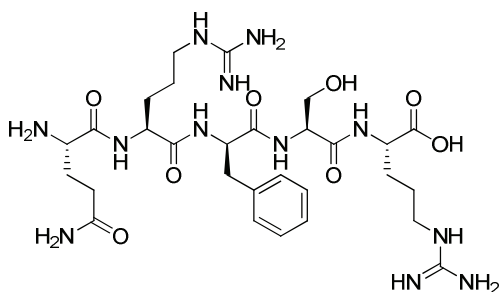
M.3.3.1.6. Síntesi i caracterització d'[Ala⁵]opiorfina



El pèptid [Ala⁵]opiorfina (H-Gln-Arg-Phe-Ser-Ala-OH) es va sintetitzar a partir de 100 mg (0,067 mmol) de la resina Fmoc-Ala-WANG emprant els següents aminoàcids protegits: Fmoc-Ser(^tBu)-OH, Fmoc-Phe-OH,

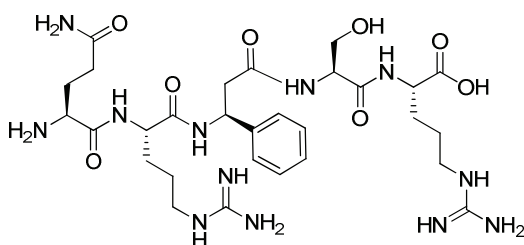
Fmoc-Arg(Pmc)-OH i Fmoc-Gln(Trt)-OH. El cru es va purificar per RP-HPLC preparativa amb el sistema *Versaflash*TM (De (5:95) (ACN:H₂O) a (50:50) (ACN:H₂O) en 50 min amb un cartutx de RP de C₁₈) per obtenir 28 mg d'un sòlid blanc caracteritzat com a [Ala⁵]opiorfina. Caracterització: RP-HPLC analítica (De (20:80) (0,1%TFA en ACN: 0,1%TFA en H₂O) a (80:20) (0,1%TFA en ACN: 0,1%TFA en H₂O) en 25 min, t.r.: 11,86 min). UPLC-HRMS(ESI/TOF): 608,3166 ([M+H]⁺, C₂₆H₄₂N₉O₈⁺; calc. 608,3156).

M.3.3.1.7. Síntesi i caracterització de [D-Phe³]opiorfina



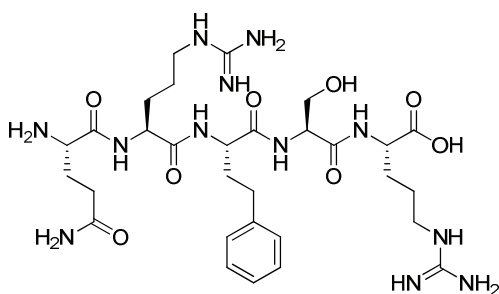
El pèptid [D-Phe³]opiorfina (H-Gln-Arg-D-Phe-Ser-Arg-OH) es va sintetitzar a partir de 47 mg (0,031 mmol) de la resina Fmoc-Ser(^tBu)-Arg(Pmc)-WANG emprant els següents aminoàcids protegits: Fmoc-DPhe-OH (2 eq., 20 h), Fmoc-Arg(Pmc)-OH i Fmoc-Gln(Trt)-OH. El cru es va purificar per RP-HPLC preparativa amb el sistema *Versaflash*TM (De (5:95) (ACN:H₂O) a (50:50) (ACN:H₂O) en 50 min amb un cartutx de RP de C₁₈) per obtenir 17,4 mg d'un sòlid blanc caracteritzat com a [D-Phe³]opiorfina. Caracterització: RP-HPLC analítica (De (20:80) (0,1%TFA en ACN: 0,1%TFA en H₂O) a (80:20) (0,1%TFA en ACN: 0,1%TFA en H₂O) en 25 min, t.r.: 9,23 min). UPLC-HRMS(ESI/TOF): 693,3790 ([M+H]⁺, C₂₉H₄₉N₁₂O₈⁺; calc. 693,3796).

M.3.3.1.8. Síntesi i caracterització de [D-β-Phe³]opiorfina



El pèptid [D-β-Phe³]opiorfina (H-Gln-Arg-D-β-Phe-Ser-Arg-OH) es va sintetitzar a partir de 100 mg (0,046 mmol) de la resina H-Ser(^tBu)-Arg(Pmc)-WANG emprant els següents aminoàcids protegits: Fmoc-D-β-Phe-OH (2 eq., 4 h), Fmoc-Arg(Pmc)-OH i Fmoc-Gln(Trt)-OH. El cru es va purificar per RP-HPLC preparativa amb el sistema *Versaflash*TM (De (5:95) (ACN:H₂O) a (50:50) (ACN:H₂O) en 50 min amb un cartutx de RP de C₁₈) per obtenir 31 mg d'un sòlid blanc caracteritzat com a [D-β-Phe³]opiorfina. Caracterització: RP-HPLC analítica (De (20:80) (0,1%TFA en ACN: 0,1%TFA en H₂O) a (80:20) (0,1%TFA en ACN: 0,1%TFA en H₂O) en 25 min, t.r.: 7,27 min). UPLC-HRMS(ESI/TOF): 693,3865 ([M+H]⁺, C₂₉H₄₉N₁₂O₈⁺; calc. 693,3796).

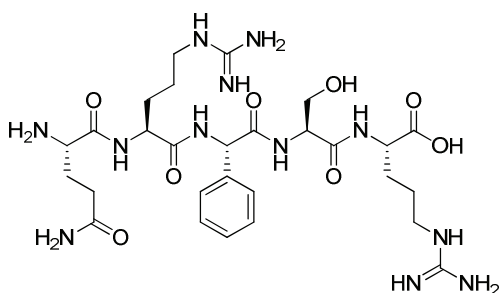
M.3.3.1.9. Síntesi i caracterització de [Hhe³]opiorfina



El pèptid [Hhe³]opiorfina (H-Gln-Arg-Hhe-Ser-Arg-OH) es va sintetitzar a partir de 100 mg (0,046 mmol) de la resina H-Ser(^tBu)-Arg(Pmc)-WANG emprant els següents aminoàcids protegits: Fmoc-Hhe-OH (2 eq., 20 h), Fmoc-Arg(Pmc)-OH i Fmoc-Gln(Trt)-OH. El cru es va purificar per RP-

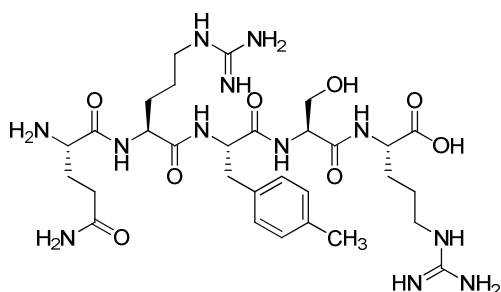
HPLC preparativa amb el sistema *Versaflash*TM (De (5:95) (ACN:H₂O) a (50:50) (ACN:H₂O) en 50 min amb un cartutx de RP de C₁₈) per obtenir 25 mg d'un sòlid blanc caracteritzat com a [Hhe³]opiorfina. Caracterització: RP-HPLC analítica (De (20:80) (0,1%TFA en ACN: 0,1%TFA en H₂O) a (80:20) (0,1%TFA en ACN: 0,1%TFA en H₂O) en 25 min, t.r.: 10,95 min). UPLC-HRMS(ESI/TOF): 707,3955 ([M+H]⁺, C₃₀H₅₁N₁₂O₈⁺; calc. 707,3953).

M.3.3.1.10. Síntesi i caracterització de [Phg³]opiorfina



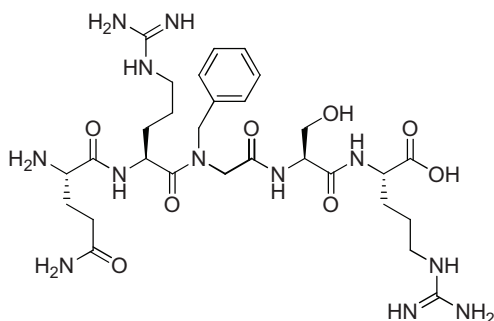
El pèptid [Phg³]opiorfina (H-Gln-Arg-Phg-Ser-Arg-OH) es va sintetitzar a partir de 100 mg (0,046 mmol) de la resina H-Ser(^tBu)-Arg(Pmc)-WANG emprant els següents aminoàcids protegits: Fmoc-Phg-OH (2 eq., 20 h), Fmoc-Arg(Pmc)-OH i Fmoc-Gln(Trt)-OH. El cru es va purificar per RP-HPLC preparativa amb el sistema *Versaflash*TM (De (5:95) (ACN:H₂O) a (50:50) (ACN:H₂O) en 50 min amb un cartutx de RP de C₁₈) per obtenir 29 mg d'un sòlid blanc caracteritzat com a [Phg³]opiorfina. Caracterització: RP-HPLC analítica (De (20:80) (0,1%TFA en ACN: 0,1%TFA en H₂O) a (80:20) (0,1%TFA en ACN: 0,1%TFA en H₂O) en 25 min, t.r.: 4,67 min). UPLC-HRMS(ESI/TOF): 679,3644 ([M+H]⁺, C₂₈H₄₇N₁₂O₈⁺; calc. 679,3640).

M.3.3.1.11. Síntesi i caracterització de [4-Me-Phe³]opiorfina



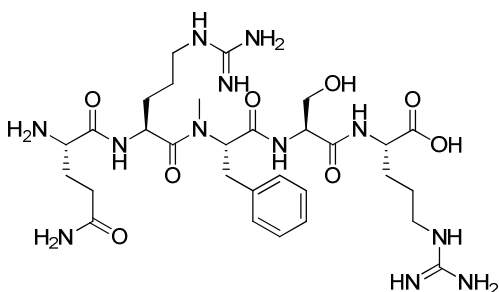
El pèptid [4-Me-Phe³]opiorfina (H-Gln-Arg-(4-Me)Phe-Ser-Arg-OH) es va sintetitzar a partir de 100 mg (0,046 mmol) de la resina H-Ser(^tBu)-Arg(Pmc)-WANG emprant els següents aminoàcids protegits: Fmoc-(4-Me)Phe-OH (2 eq., 20 h), Fmoc-Arg(Pmc)-OH i Fmoc-Gln(Trt)-OH. El cru es va purificar per RP-HPLC preparativa amb el sistema *Versaflash*TM (De (5:95) (ACN:H₂O) a (50:50) (ACN:H₂O) en 50 min amb un cartutx de RP de C₁₈) per obtenir 23 mg d'un sòlid blanc caracteritzat com a [4-Me-Phe³]opiorfina. Caracterització: RP-HPLC analítica (De (20:80) (0,1%TFA en ACN: 0,1%TFA en H₂O) a (80:20) (0,1%TFA en ACN: 0,1%TFA en H₂O) en 25 min, t.r.: 12,24 min). UPLC-HRMS(ESI/TOF): 707,3962 ([M+H]⁺, C₃₀H₅₁N₁₂O₈⁺; calc. 707,3953).

M3.3.1.12. Síntesi i caracterització de [Nphe³]opiorfina



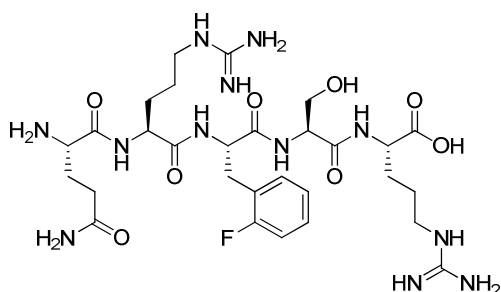
El pèptid [Nphe³]opiorfina (H-Gln-Arg-Nphe-Ser-Arg-OH) es va sintetitzar a partir de 100 mg (0,046 mmol) de la resina H-Ser(^tBu)-

M.3.3.1.13. Síntesi i caracterització de [N-Me-Phe³]opiorfina



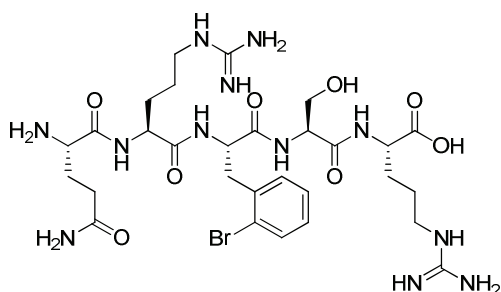
188

M3.3.1.14. Síntesi i caracterització de [2-F-Phe³]opiorfina



El pèptid [2-F-Phe³]opiorfina (H-Gln-Arg-(2-F)Phe-Ser-Arg-OH) es va sintetitzar a partir de 44 mg (0,030 mmol) de la resina Fmoc-Arg(Pmc)-WANG (de substitució: 0,61 mmol/g resina) emprant els següents aminoàcids protegits: Fmoc-Ser(^tBu)-OH, Fmoc-(2-F)Phe-OH, Fmoc-Arg(Pmc)-OH i Fmoc-Gln(Trt)-OH. El cru es va purificar per RP-HPLC preparativa amb el sistema *Versaflash*TM (De (5:95) (ACN:H₂O) a (50:50) (ACN:H₂O) en 50 min amb un cartutx de RP de C₁₈) per obtenir 16 mg d'un sòlid blanc caracteritzat com a [2-F-Phe³]opiorfina. Caracterització: RP-HPLC analítica (De (20:80) (0,1%TFA en ACN: 0,1%TFA en H₂O) a (80:20) (0,1%TFA en ACN: 0,1%TFA en H₂O) en 25 min, t.r.: 9,18 min). UPLC-HRMS(ESI/TOF): 711,3730 ([M+H]⁺, C₂₉H₄₈N₁₂O₈F⁺; calc. 711,3702)

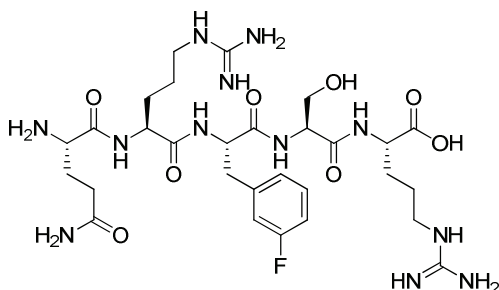
M.3.3.1.15. Síntesi i caracterització de [2-Br-Phe³]opiorfina



El pèptid [2-Br-Phe³]opiorfina (H-Gln-Arg-(2-Br)Phe-Ser-Arg-OH) es va sintetitzar a partir de 47 mg (0,031 mmol) de la resina Fmoc-Arg(Pmc)-

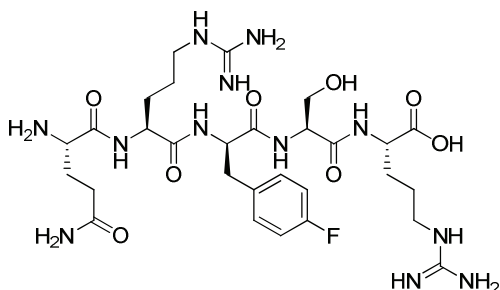
WANG (de substitució: 0,61 mmol/g resina) emprant els següents aminoàcids protegits: Fmoc-Ser(^tBu)-OH, Fmoc-(2-Br)Phe-OH, Fmoc-Arg(Pmc)-OH i Fmoc-Gln(Trt)-OH. El cru es va purificar per RP-HPLC preparativa amb el sistema *Versaflash*TM (De (5:95) (ACN:H₂O) a (50:50) (ACN:H₂O) en 50 min amb un cartutx de RP de C₁₈) per obtenir 16 mg d'un sòlid blanc caracteritzat com a [2-Br-Phe³]opiorfina. Caracterització: RP-HPLC analítica (De (20:80) (0,1%TFA en ACN: 0,1%TFA en H₂O) a (80:20) (0,1%TFA en ACN: 0,1%TFA en H₂O) en 25 min, t.r.: 12,03 min). UPLC-HRMS(ESI/TOF): 771,2931 ([M+H]⁺, C₂₉H₄₈N₁₂O₈Br⁺; calc. 771,2901).

M.3.3.1.16. Síntesi i caracterització de [3-F-Phe³]opiorfina



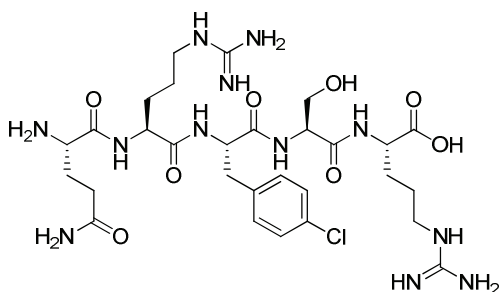
El pèptid [3-F-Phe³]opiorfina (H-Gln-Arg-(3-F)Phe-Ser-Arg-OH) es va sintetitzar a partir de 100 mg de la resina H-Ser(^tBu)-Arg(Pmc)-WANG emprant els següents aminoàcids protegits: Fmoc-(3-F)Phe-OH (2 eq., 20 h), Fmoc-Arg(Pmc)-OH i Fmoc-Gln(Trt)-OH. El cru es va purificar per RP-HPLC preparativa amb el sistema *Versaflash*TM (De (5:95) (ACN:H₂O) a (50:50) (ACN:H₂O) en 50 min amb un cartutx de RP de C₁₈) per obtenir 34 mg d'un sòlid blanc caracteritzat com a [3-F-Phe³]opiorfina. Caracterització: RP-HPLC analítica (De (20:80) (0,1%TFA en ACN: 0,1%TFA en H₂O) a (80:20) (0,1%TFA en ACN: 0,1%TFA en H₂O) en 25 min, t.r.: 10,62 min). UPLC-HRMS(ESI/TOF): 711,3676 ([M+H]⁺, C₂₉H₄₈N₁₂O₈F⁺; calc. 711,3702).

M.3.3.1.17. Síntesi i caracterització de [4-F-D-Phe³]opiorfina



El pèptid [4-F-D-Phe³]opiorfina (H-Gln-Arg-(4-F)-D-Phe-Ser-Arg-OH) es va sintetitzar a partir de 100 mg (0,046 mmol) de la resina H-Ser(^tBu)-Arg(Pmc)-WANG emprant els següents aminoàcids protegits: Fmoc-(4-F)D-Phe-OH (2 eq., 4 h), Fmoc-Arg(Pmc)-OH i Fmoc-Gln(Trt)-OH. El cru es va purificar per RP-HPLC preparativa amb el sistema *Versaflash*TM (De (5:95) (ACN:H₂O) a (50:50) (ACN:H₂O) en 50 min amb un cartutx de RP de C₁₈) per obtenir 34 mg d'un sòlid blanc caracteritzat com a [4-F-D-Phe³]opiorfina. Caracterització: RP-HPLC analítica (De (20:80) (0,1%TFA en ACN: 0,1%TFA en H₂O) a (80:20) (0,1%TFA en ACN: 0,1%TFA en H₂O) en 25 min, t.r.: 3,84 min). UPLC-HRMS(ESI/TOF): 711,3698 ([M+H]⁺, C₂₉H₄₈N₁₂O₈F⁺; calc. 711,3702).

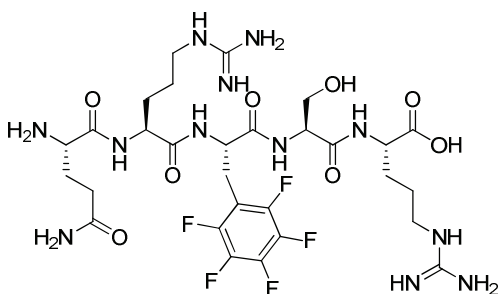
M.3.3.1.18. Síntesi i caracterització de [4-Cl-Phe³]opiorfina



El pèptid [4-Cl-Phe³]opiorfina (H-Gln-Arg-(4-Cl)-Phe-Ser-Arg-OH) es va sintetitzar a partir de 100 mg (0,046 mmol) de la resina H-Ser(^tBu)-

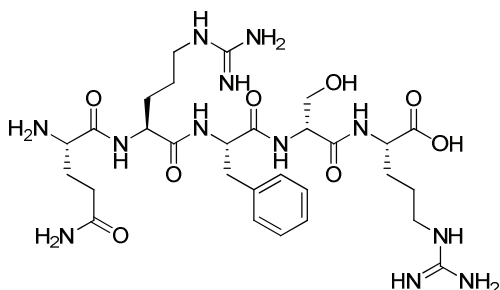
Arg(Pmc)-WANG emprant els següents aminoàcids protegits: Fmoc-(4-Cl)Phe-OH (2 eq., 20 h), Fmoc-Arg(Pmc)-OH i Fmoc-Gln(Trt)-OH. El cru es va purificar per RP-HPLC preparativa amb el sistema *Versaflash*TM (De (5:95) (ACN:H₂O) a (50:50) (ACN:H₂O) en 50 min amb un cartutx de RP de C₁₈) per obtenir 3 mg d'un sòlid groguenc caracteritzat com a [4-Cl-Phe³]opiorfina. Caracterització: RP-HPLC analítica (De (20:80) (0,1%TFA en ACN: 0,1%TFA en H₂O) a (80:20) (0,1%TFA en ACN: 0,1%TFA en H₂O) en 25 min, t.r.: 7,92 min). UPLC-HRMS(ESI/TOF): 727,3403 ([M+H]⁺, C₂₉H₄₈N₁₂O₈Cl⁺; calc. 727,3407).

M.3.3.1.19. Síntesi i caracterització de [2,3,4,5,6-F-Phe³]opiorfina



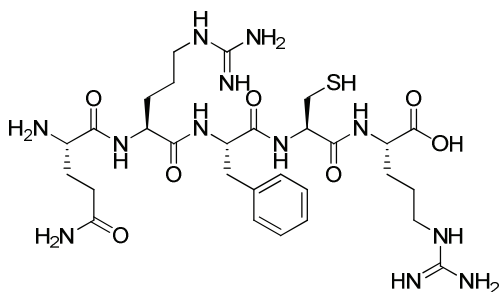
El pèptid [2,3,4,5,6-F-Phe³]opiorfina (H-Gln-Arg-(2,3,4,5,6-F)Phe-Ser-Arg-OH) es va sintetitzar a partir de 50 mg (0,030 mmol) de la resina Fmoc-Arg(Pmc)-WANG (de substitució: 0,61 mmol/g resina) emprant els següents aminoàcids protegits: Fmoc- Ser(^tBu)-OH, Fmoc-(2,3,4,5,6-penta-F)Phe-OH (2 eq., 20 h), Fmoc-Arg(Pmc)-OH i Fmoc-Gln(Trt)-OH. El cru es va purificar per RP-HPLC preparativa amb el sistema *Versaflash*TM (De (5:95) (ACN:H₂O) a (50:50) (ACN:H₂O) en 50 min amb un cartutx de RP de C₁₈) per obtenir 16 mg d'un sòlid blanc caracteritzat com a [2,3,4,5,6-F-Phe³]opiorfina. Caracterització: RP-HPLC analítica (De (20:80) (0,1%TFA en ACN: 0,1%TFA en H₂O) a (80:20) (0,1%TFA en ACN: 0,1%TFA en H₂O) en 25 min, t.r.: 12,02 min). UPLC-HRMS(ESI/TOF): 783,3403 ([M+H]⁺, C₂₉H₄₄N₁₂O₈F₅⁺; calc. 783,3325).

M.3.3.1.20. Síntesi i caracterització de [D-Ser⁴]opiorfina



El pèptid [D-Ser⁴]opiorfina (H-Gln-Arg-Phe-D-Ser-Arg-OH) es va sintetitzar a partir de 200 mg (0,082 mmol) de la resina H-Arg(Pmc)-WANG emprant els següents aminoàcids protegits: Fmoc-D-Ser-OH (2 eq., 20 h), Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Arg(Pmc)-OH i Fmoc-Gln(Trt)-OH. El cru es va purificar per RP-HPLC preparativa amb el sistema *Versaflash*TM (De (5:95) (ACN:H₂O) a (50:50) (ACN:H₂O) en 50 min amb un cartutx de RP de C₁₈) per obtenir 40 mg d'un sòlid blanc caracteritzat com a [D-Ser⁴]opiorfina. Caracterització: RP-HPLC analítica (De (20:80) (0,1%TFA en ACN: 0,1%TFA en H₂O) a (80:20) (0,1%TFA en ACN: 0,1%TFA en H₂O) en 25 min, t.r.: 9,71 min). UPLC-HRMS(ESI/TOF): 693,3773 ([M+H]⁺, C₂₉H₄₉N₁₂O₈⁺; calc. 693,3796).

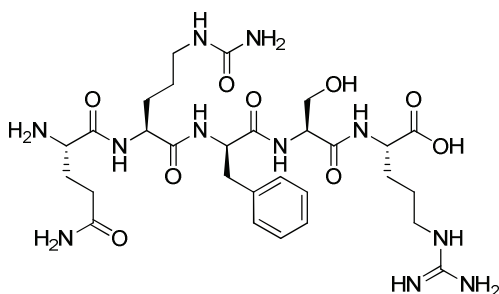
M.3.3.1.21. Síntesi i caracterització de [Cys⁴]opiorfina



El pèptid [Cys⁴]opiorfina (H-Gln-Arg-Phe-Cys-Arg-OH) es va sintetitzar a partir de 50 mg (0,021 mmol) de la resina H-Arg(Pmc)-WANG

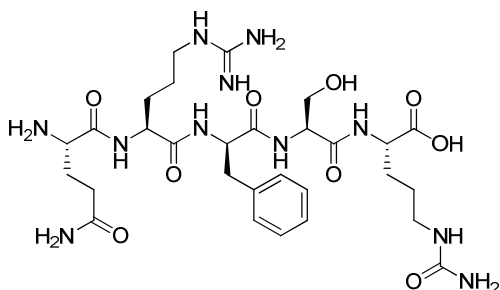
emprant els següents aminoàcids protegits: Fmoc-Cys(Trt)-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Arg(Pmc)-OH (20 h) i Fmoc-Gln(Trt)-OH. El cru es va purificar per RP-HPLC preparativa amb el sistema *Versaflash*TM (De (5:95) (ACN:H₂O) a (50:50) (ACN:H₂O) en 50 min amb un cartutx de RP de C₁₈) per obtenir 15 mg d'un sòlid blanc caracteritzat com a [Cys⁴]opiorfina. Caracterització: RP-HPLC analítica (De (20:80) (0,1%TFA en ACN: 0,1%TFA en H₂O) a (80:20) (0,1%TFA en ACN: 0,1%TFA en H₂O) en 25 min, t.r.: 9,77 min). UPLC-HRMS(ESI/TOF): 709,3512 ([M+H]⁺, C₂₉H₄₉N₁₂O₇S⁺; calc. 709,3568).

M.3.3.1.22. Síntesi i caracterització de [Cit²]opiorfina



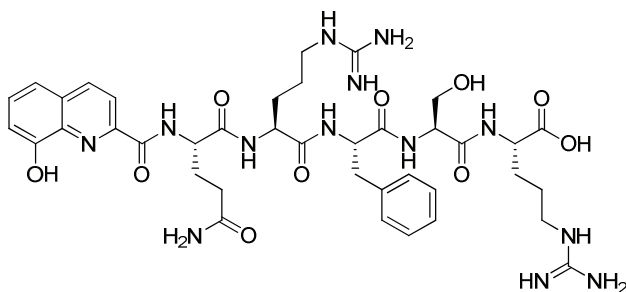
El pèptid [Cit²]opiorfina (H-Gln-Cit-Phe-Ser-Arg-OH) es va sintetitzar a partir de 43 mg (0,028 mmol) de la resina H-Ser(^tBu)-Arg(Pmc)-WANG emprant els següents aminoàcids protegits: Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Cit-OH (20 h) i Fmoc-Gln(Trt)-OH. El cru es va purificar per RP-HPLC preparativa amb el sistema *Versaflash*TM (De (0:100) (ACN:H₂O) a (50:50) (ACN:H₂O) en 50 min amb un cartutx de RP de C₁₈) per obtenir 10,6 mg d'un sòlid blanc caracteritzat com a [Cit²]opiorfina. Caracterització: RP-HPLC analítica (De (10:90) (0,1%TFA en ACN: 0,1%TFA en H₂O) a (90:10) (0,1%TFA en ACN: 0,1%TFA en H₂O) en 30 min, t.r.: 7,85 min). UPLC-HRMS(ESI/TOF): 694,3613 ([M+H]⁺, C₂₉H₄₈N₁₁O₉⁺; calc. 694,3636).

M.3.3.1.23. Síntesi i caracterització de [Cit⁵]opiorfina



El pèptid [Cit⁵]opiorfina (H-Gln-Arg-Phe-Ser-Cit-OH) es va sintetitzar a partir de 59 mg (0,035 mmol) de la resina H-Cit-WANG emprant els següents aminoàcids protegits: Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Phe-OH (20 h), Fmoc-Arg-OH (4 h) i Fmoc-Gln(Trt)-OH (20 h). El cru es va purificar per RP-HPLC preparativa (De (0:100) (ACN:H₂O) a (50:50) (ACN:H₂O) en 50 min amb una columna *Versaflash*TM de C₁₈) per obtenir 7,3 mg d'un sòlid blanc caracteritzat com a [Cit²]opiorfina. Caracterització: RP-HPLC analítica (De (20:80) (0,1%TFA en ACN: 0,1%TFA en H₂O) a (80:20) (0,1%TFA en ACN: 0,1%TFA en H₂O) en 25 min, t.r.: 8,56 min). UPLC-HRMS(ESI/TOF): 694,3671 ([M+H]⁺, C₂₉H₄₈N₁₁O₉⁺; calc. 694,3636).

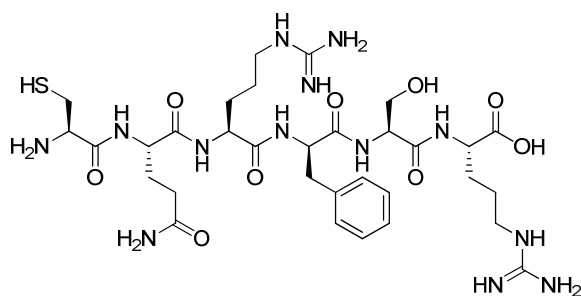
M.3.3.1.24. Síntesi i caracterització de [HQ⁰]opiorfina



El pèptid [HQ⁰]opiorfina (Hidroxiquinolina-Gln-Arg-Phe-Cys-Arg-OH) es va sintetitzar a partir de 124 mg (0,067 mmol) de la resina H-Gln(Trt)-

Arg(Pmc)-Phe-Ser(^tBu)-Arg(Pmc)-WANG emprant el procediment de síntesi en fase sòlida en DMF amb 6 eq. DIEA, 5 eq. PyBOP i 5 eq. d'àcid 8-hidroxiquinolin-2-carboxílic durant 20 h. El desancorament es va realitzar seguint el procediment general. El cru es va purificar per RP-HPLC preparativa amb el sistema *Versaflash*TM (De (0:100) (MeOH:H₂O) a (40:60) (MeOH:H₂O) 0–40% en 50 min amb un cartutx de RP de C₁₈) per obtenir 20 mg d'un sòlid blanc caracteritzat com a [HQC(OO⁰)]opiorfina. Caracterització: RP-HPLC analítica (De (10:90) (0,1%TFA en MeOH: 0,1%TFA en H₂O) a (90:10) (0,1%TFA en MeOH: 0,1%TFA en H₂O) en 30 min, t.r.: 15,95 min). UPLC-HRMS(ESI/TOF): 864,4101 ([M+H]⁺, C₃₉H₅₄N₁₃O₁₀⁺; calc. 864,4117).

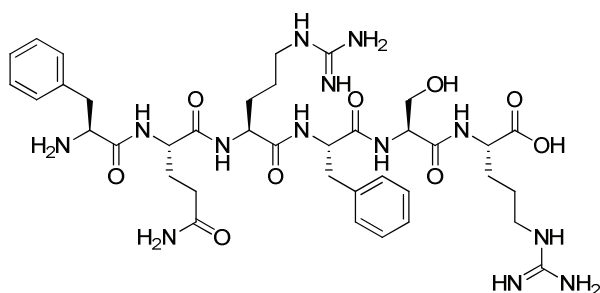
M.3.3.1.25. Síntesi i caracterització de [Cys⁰, D-Phe³]opiorfina



El pèptid [Cys⁰, D-Phe³]opiorfina (H-Cys-Gln-Arg-D-Phe-Ser-Arg-OH) es va sintetitzar a partir de 100 mg (0,046 mmol) de la resina H-Ser(^tBu)-Arg(Pmc)-WANG emprant els següents aminoàcids protegits: Fmoc-D-Phe-OH (2 eq., 3 h), Fmoc-Arg(Pmc)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH i Fmoc-Cys(Trt)-OH (20 h). El cru es va purificar per RP-HPLC preparativa amb el sistema *Versaflash*TM (De (0:100) (ACN:H₂O) a (50:50) (ACN:H₂O) en 50 min amb un cartutx de RP de C₁₈) per obtenir 20 mg d'un sòlid blanc caracteritzat com a [D-Ser⁴]opiorfina. Caracterització: RP-HPLC analítica (De (10:90) (0,1%TFA en ACN: 0,1%TFA en H₂O) a (90:10) (0,1%TFA

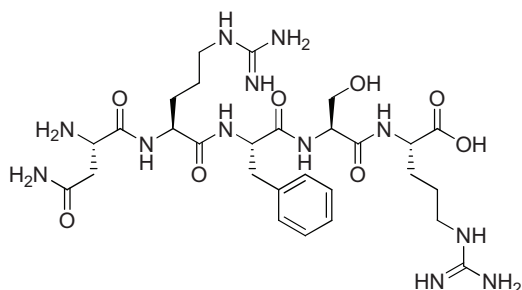
en ACN: 0,1%TFA en H₂O) en 30 min, t.r.: 9,53 min). UPLC-HRMS(ESI/TOF): 796,3865 ([M+H]⁺, C₃₂H₅₄N₁₃O₉S⁺; calc. 796,3888).

M.3.3.1.26. Síntesi i caracterització de [Phe⁰]opiorfina



El pèptid [Phe⁰]opiorfina (H-Phe-Gln-Arg-Phe-Ser-Arg-OH) es va sintetitzar a partir de 87 mg (0,047 mmol) de la resina H-Gln(Trt)-Arg(Pmc)-Phe-Ser(tBu)-Arg(Pmc)-WANG emprant el següent aminoàcid protegit: Fmoc-Phe-OH. El cru es va purificar per RP-HPLC preparativa amb el sistema *Versaflash*TM (De (0:100) (ACN:H₂O) a (20:80) (ACN:H₂O) en 50 min amb un cartutx de RP de C₁₈) per obtenir 40,7 mg d'un sòlid blanc caracteritzat com a [Phe⁰]opiorfina. Caracterització: RP-HPLC analítica (De (20:80) (0,1%TFA en MeOH: 0,1%TFA en H₂O) a (80:20) (0,1%TFA en MeOH: 0,1%TFA en H₂O) en 25 min, t.r.: 14,22min). UPLC-HRMS(ESI/TOF): 840,4517 ([M+H]⁺, C₃₈H₅₈N₁₃O₉⁺; calc. 840,4480).

M.3.3.1.27. Síntesi i caracterització d'[Asn¹]opiorfina



El pèptid [Asn¹]opiorfina (H-Asn-Arg-Phe-Ser-Arg-OH) es va sintetitzar a partir de 250 mg (0,135 mmol) de la resina H-Arg(Pmc)-WANG emprant els següents aminoàcids protegits: Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Arg(Pmc)-OH and Fmoc-Asn(Trt)-OH. El cru es va purificar per RP-HPLC preparativa amb el sistema *Versaflash*TM (De (0:100) (ACN:H₂O) a (30:70) (ACN:H₂O) en 50 min amb un cartutx de RP de C₁₈) per obtenir 51 mg d'un sòlid blanc caracteritzat com a [Asn¹]opiorfina. Caracterització: RP-HPLC analítica (De (20:80) (0,1%TFA en ACN: 0,1%TFA en H₂O) a (80:20) (0,1%TFA en ACN: 0,1%TFA en H₂O) en 25 min, t.r.: 14,80min). UPLC-HRMS(ESI/TOF): 679,3640 ([M+H]⁺, C₂₈H₄₇N₁₂O₈⁺; calc. 679,3640).

M.3.3.2. Assajos d'inhibició in vitro per AP-N i NEP

M.3.3.2.1. assaig d'inhibició de fluorescència per AP-N

En una microplaca de 96 pouets negres amb fons transparent s'hi van afegir les diferents mescles de reacció consistents en 4 ng de AP-N humà recombinant dissolt en 100 µL de Tris-HCl 100 mM pH 7.0 i la concentració d'inhibidor adequada per cada assaig de 0 a 100 µM. Simultàniament es va realitzar també un control sense enzim, només amb tampó de reacció. Es va realitzar una preincubació durant 10 min a 28°C, després de la qual es va afegir el substrat específic Ala-AMC amb una concentració final de 25 µM. La cinètica d'aparició del senyal fluorescent es va monitoritzar durant 40 min a 28°C mitjançant un fluorímetre amb una longitud d'ona d'excitació de 380 nm i 460 nm d'emissió. Es va comprovar la linealitat de l'aparició del senyal durant els primers 10-40 min per realitzar el càlcul d'inhibició tal i com s'explica a l'apartat 3.4.2.

Els inhibidors assajats específicament per la doctoranda durant la seva estada al Pasteur de París es desglosen a la següent taula:

Pèptids	Seqüència peptídica	IC ₅₀ AP-N (µM)
Opiorfina	H-Gln-Arg-Phe-Ser-Arg-OH	8,1 ± 0,1
[Ala ¹]opiorfina	H- Ala -Arg-Phe-Ser-Arg-OH	37 ± 3
[Ala ²]opiorfina	H-Gln- Ala -Phe-Ser-Arg-OH	65 ± 3
[Ala ³]opiorfina	H-Gln-Arg- Ala -Ser-Arg-OH	>70
[Ala ⁴]opiorfina	H-Gln-Arg-Phe- Ala -Arg-OH	47 ± 2
[Ala ⁵]opiorfina	H-Gln-Arg-Phe-Ser- Ala -OH	>70
[o-F-Phe ³]opiorfina	H-Gln-Arg-(o-F)- Phe -Ser-Arg-OH	44 ± 3
[o-Br-Phe ³]opiorfina	H-Gln-Arg-(o-Br)- Phe -Ser-Arg-OH	65 ± 4
[2,3,4,5,6-pentafluoroPhe ³]opiorfina	H-Gln-Arg-(2,3,4,5,6-pentafluoro)- Phe -Ser-Arg-OH	>100
[D-Phe ³]opiorfina	H-Gln-Arg- D-Phe -Ser-Arg-OH	0,5 ± 0,1
[Cys ⁴]opiorfina	H-Gln-Arg-Phe- Cys -Arg-OH	20

Taula M.1. Llistat de pèptids assajats durant l'estada a l'Institut Pasteur com a possibles inhibidors de AP-N humà.

M.3.3.2.2. assaig d’inhibició de tipus FRET per NEP.

En una microplaca de 96 pouets negres amb fons transparent s’hi van afegir les diferents mescles de reacció consistents en 12,5 ng de NEP recombinant humà dissolt en 100 µL de Tris-HCl 100 mM pH 7.0, NaCl 200 mM i Brij35 al 0,05%; així com la concentració d’inhibidor adequada per cada assaig de 0 a 100 µM. Simultàniament es va realitzar també un control sense enzim, només amb tampó de reacció. Es va realitzar una preincubació durant 10 min a 28°C, després de la qual es la afegir el substrat específic Abz-DArg-Gly-Leu-EDDnp amb una concentració final de 15 µM. La cinètica d’aparició del senyal fluorescent es va monitoritzar durant 40 min a 28°C mitjançant un fluorímetre amb una longitud d’ona

d'excitació de 320 nm i 420 nm d'emissió. Es va comprovar la linealitat de l'aparició del senyal durant els primers 10-40 min per realitzar el càlcul d'inhibició tal i com s'explica a l'apartat 3.4.2.

Els inhibidors assajats específicament per la doctoranda durant la seva estada al Pasteur de París es desglosen a la següent taula:

Pèptids	Seqüència peptídica	IC ₅₀ NEP (μM)
Opiorfina	H-Gln-Arg-Phe-Ser-Arg-OH	30 ± 3
[Ala ¹]opiorfina	H- Ala -Arg-Phe-Ser-Arg-OH	>70
[Ala ²]opiorfina	H-Gln- Ala -Phe-Ser-Arg-OH	12 ± 1
[Ala ³]opiorfina	H-Gln-Arg- Ala -Ser-Arg-OH	>100
[Ala ⁴]opiorfina	H-Gln-Arg-Phe- Ala -Arg-OH	39 ± 2
[Ala ⁵]opiorfina	H-Gln-Arg-Phe-Ser- Ala -OH	33 ± 2
[o-F-Phe ³]opiorfina	H-Gln-Arg-(o-F)- Phe -Ser-Arg-OH	48 ± 3
[o-Br-Phe ³]opiorfina	H-Gln-Arg-(o-Br)- Phe -Ser-Arg-OH	30 ± 2
[2,3,4,5,6-pentafluoroPhe ³]opiorfina	H-Gln-Arg-(2,3,4,5,6-pentafluoro)- Phe -Ser-Arg-OH	>100
[D-Phe ³]opiorfina	H-Gln-Arg- D-Phe -Ser-Arg-OH	>100
[Cys ⁴]opiorfina	H-Gln-Arg-Phe- Cys -Arg-OH	>100

Taula M.2. Llistat de pèptids assajats durant l'estada a l'Institut Pasteur com a possibles inhibidors de NEP humà.

Conclusions generals

1.- S'ha contribuït a una millor caracterització del RO amb el desenvolupament i l'aplicació conjunta d'una metodologia proteòmica i una de iodació amb el reactiu IPy₂BF₄ prèviament optimitzades en proteïnes patró.

2a.- A través d'estudis SAR de glicopèptids opioides derivats del pèptid de Bajusz s'ha vist que la part del carbohidrat no té un paper important en la modulació de la seva afinitat pel RO ni tampoc sobre la conformació de la part peptídica, per tant, és d'esperar que la seva gran potència *in vivo* sigui deguda a factors de tipus ADME.

2b.- Els estudis SAR de Leu-encefalina i endomorfina-1 i de modelització molecular de la seva unió al RO han permès suggerir que la modulació de l'activitat d'aquests lligands per halogenació en els residus de Phe⁴ es produeix per efectes estèrics o bé per creació de noves interaccions de tipus d'enllaç d'halogen.

3.- Els estudis SAR del pèptid analgèsic opiorfina que exerceix la seva acció per la inhibició dual de les encefalinases NEP i AP-N, amb conjunció amb estudis conformationals i de modelització molecular, han permès posar de manifest la importància que té el residu Phe³ per la seva activitat i que les conformacions bioactives calculades per a cada un dels enzims presenten molt poca similitud.

Bibliografia

- [1] Marató TV3 - Edició 2006. <http://www.tv3.cat/marato/arxiu/2006>.
- [2] Disseny racional, síntesi i caracterització d'anàlegs d'opiorfina i M6G: vers un millor coneixement dels mecanismes del dolor, que tenia com a finalitat contribuir al descobriment de nous fàrmacs analgèsics <http://www.igac.csic.es/UQG/ProjecteLaMaratodeTV3/>.
- [3] J. J. Bonica, Editorial The need of a taxonomy. *PAIN* **1979**, 6, 247.
- [4] A. V. Holden, W. Winlow, *The Neurobiology of Pain: Symposium of the Northern Neurobiology Group, held at Leeds on 18 April 1983, 1984*.
- [5] D. Niv, S. Kreidler, B. Diego, A. Lamberto, *The Handbook of Chronic Pain*, **2007**.
- [6] Universidad de Salamanca <http://www.masterdolor.com/>.
- [7] American Pain Society http://www.americanpainsociety.org/http://clinicalcenter.nih.gov/ccnursepractitioners/pdfs/pain_management_text.pdf.
- [8] Enquesta del Departament de Salut de la Generalitat de Catalunya http://www20.gencat.cat/docs/salut/Home/EI%20Departament/Estadistiques%20sanitaries/Enquestes/02_enquesta_catalunya_continua/Documents/informeasca2011.pdf.
- [9] Universitat de Waterloo, Ontario. <http://iris.uwaterloo.ca/ethics/>.
- [10] Organització Mundial de la Salut <http://www.who.int/about/es>.
- [11] WHO, *World Health Organization - Traitement de la douleur cancéreuse*, Geneva, Switz, **1987**.
- [12] G. Vargas-Schaffer, Is the WHO analgesic ladder still valid?: Twenty-four years of experience. *Can. Fam. Physician* **2010**, 56, 514.
- [13] M. McIntosh, L. J. Cruz, H. M. W, G. W. R, O. B. M, Isolation and structure of a peptide toxin from the marine snail *Conus magus*. *Arch. Biochem. Biophys.* **1982**, 218, 329.
- [14] M. J. Skov, J. C. Beck, A. W. deKater, G. M. Shopp, Nonclinical safety of ziconotide: an intrathecal analgesic of a new pharmaceutical class. *Int. J. Toxicol.* **2007**, 26, 411.

- [15] W. R. Martin, Opioid Antagonists. *Pharmacol. Rev.* **1967**, *19*, 463.
- [16] A. Goldstein, L. I. Lowney, B. K. Pal, Stereospecific and Nonspecific Interactions of the Morphine Congener Levorphanol in Subcellular Fractions of Mouse Brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1971**, *68*, 1742.
- [17] a) L. Lasagna, H. K. Beecher, Analgesic effectiveness of nalorphine and nalorphine-morphine combinations in man. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1954**, *112*, 356; b) R. W. Houde, S. L. Wallenstein, Clinical studies of morphine-nalorphine combinations. *Fedn. Proc.* **1956**, *15*, 440.
- [18] W. R. Martin, C. G. Eades, J. A. Thompson, The effects of morphine and nalorphine-like drugs in the nondependent and morphine-dependent chronic spinal dog. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1976**, *197*, 517.
- [19] J. A. H. Lord, A. A. Waterfield, J. Hughes, H. W. Kosterlitz, Endogenous opioid peptides: multiple agonists and receptors. *Nature* **1977**, *276*, 495.
- [20] a) J. C. Meunier, C. Mollereau, L. Toll, C. Suaudeau, C. Moisand, P. Alvinerie, J. L. Butour, J. C. Guillemot, P. Ferrara, B. Monsarrat, Isolation and structure of the endogenous agonist of opioid receptor like ORL1 receptor. *Nature* **1995**, *377*, 532; b) R. K. Reinscheid, H. P. Nothacker, A. Bourson, A. Ardati, R. A. Henningsen, J. R. Bunzow, D. K. Grandy, H. Langen, F. J. J. Monsma, O. Civelli, Orphanin FQ a neuropeptide that activates an opioid like G protein coupled receptor. *Science* **1995**, *270*, 792.
- [21] a) J. R. Bunzow, C. Saez, M. Mortrud, C. Bouvier, J. T. Williams, M. Low, D. K. Grandy, Molecular cloning and tissue distribution of a putative member of the rat opioid receptor gene family that is not a μ , δ or κ opioid receptor type. *FEBS Lett.* **1994**, *347*, 284; b) K. Fukuda, S. Kato, K. Mori, M. Nishi, H. Takeshima, N. Iwabe, T. Miyata, T. Houtani, T. Sugimoto, cDNA cloning and regional distribution of a novel member of the opioid receptor family. *FEBS Lett.* **1994**, *343*, 42.
- [22] T. P. Caruso, D. L. Larson, P. S. Portoghese, A. E. Takemori, Isolation of selective ^3H -chlornaltrexamine-bound complexes, possible opioid receptor components in brains of mice. *Life Sci.* **1980**, *27*, 2063.
- [23] a) C. Evans, D. Keith, H. Morrison, K. Magendzo, R. Edwards, Cloning of a delta opioid receptor by functional expression.

- Science* **1992**, 258, 1952; b) B. L. Kieffer, K. Befort, C. Gaveriaux-Ruff, C. G. Hirth, The delta-opioid receptor: isolation of a cDNA by expression cloning and pharmacological characterization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, 89, 12048; c) Y. Chen, A. Mestek, J. Liu, J. A. Hurley, L. Yu, Molecular cloning and functional expression of a mu-opioid receptor from rat brain. *Mol. Pharmacol.* **1993**, 44, 8; d) M. Minami, T. Toya, Y. Katao, K. Maekawa, S. Nakamura, T. Onogi, S. Kaneko, M. Satoh, Cloning and expression of a cDNA for the rat k-opioid receptor. *FEBS Lett.* **1993**, 329, 291.
- [24] a) V. Höllt, Multiple endogenous opioid peptides. *Trends Neurosci.* **1983**, 6, 24; b) E. Weber, C. J. Evans, J. D. Barchas, Multiple endogenous ligands for opioid receptors. *Trends Neurosci.* **1983**, 6, 333; c) H. Akil, S. J. Watson, E. Young, M. E. Lewis, H. Khachaturian, J. M. Walker, Endogenous Opioids: Biology and Function. *Annu. Rev. Neurosci.* **1984**, 7, 223.
- [25] a) G. Magnusson, G. Noori, J. Dahmen, T. Frejd, T. Lave, Boron trifluoride-etherate induced formation of 2,2,2-trichloroethyl glycopyranosides. Selective visualization of carbohydrate derivatives on TLC plates. *Acta Chem. Scand. B* **1981**, B35, 213; b) W. Brandt, Structure-activity relationships of opioids. *Pharm. Unserer Zeit.* **2002**, 31, 60; c) A. Janecka, J. Fichna, M. Mirowski, T. Janecki, Structure-activity relationship, conformation and pharmacology studies of morphiceptin analogues - selective μ -opioid receptor ligands. *Mini-Rev. Med. Chem.* **2002**, 2, 565; d) P. W. Schiller, G. Weltrowska, R. Schmidt, T. M. D. Nguyen, I. Berezowska, C. Lemieux, N. N. Chung, K. A. Carpenter, B. C. Wilkes, Marcel Dekker, Inc., **2004**, p. 147; e) D. S. Fries, *Opioid analgesics*, Lippincott Williams & Wilkins, **2008**.
- [26] A. D. Corbett, 75 years of opioid research: the exciting but vain quest for the Holy Grail. *Br. J. Pharmacol.* **2006**, 147, 153.
- [27] M. Filizola, L. A. Devi, Structural biology: How opioid drugs bind to receptors. *Nature* **2012**, 485, 314.
- [28] A. Manglik, A. C. Kruse, T. S. Kobilka, F. S. Thian, J. M. Mathiesen, R. K. Sunahara, L. Pardo, W. I. Weis, B. K. Kobilka, S. Granier, Crystal structure of the [mu]-opioid receptor bound to a morphinan antagonist. *Nature* **2012**, 485, 321.
- [29] H. Wu, D. Wacker, M. Mileni, V. Katritch, G. W. Han, E. Vardy, W. Liu, A. A. Thompson, X.-P. Huang, F. I. Carroll, S. W. Mascarella, R. B. Westkaemper, P. D. Mosier, B. L. Roth, V. Cherezov, R. C.

- Stevens, Structure of the human [kappa]-opioid receptor in complex with JDTic. *Nature* **2012**, *485*, 327.
- [30] S. Granier, A. Manglik, A. C. Kruse, T. S. Kobilka, F. S. Thian, W. I. Weis, B. K. Kobilka, Structure of the δ -opioid receptor bound to naltrindole. *Nature* **2012**, *485*, 400.
- [31] A. A. Thompson, W. Liu, E. Chun, V. Katritch, H. Wu, E. Vardy, X.-P. Huang, C. Trapella, R. Guerrini, G. Calo, B. L. Roth, V. Cherezov, R. C. Stevens, Structure of the nociceptin/orphanin FQ receptor in complex with a peptide mimetic. *Nature* **2012**, *485*, 395.
- [32] S. Naganathan, S. Ye, T. P. Sakmar, T. Huber, Site-Specific Epitope Tagging of G Protein-Coupled Receptors by Bioorthogonal Modification of a Genetically Encoded Unnatural Amino Acid. *Biochemistry* **2013**, *52*, 1028.
- [33] M. R. Wilkins, C. Pasquali, R. D. Appel, K. Ou, O. Golaz, J.-C. Sanchez, J. X. Yan, A. A. Gooley, G. Hughes, I. Humphery-Smith, K. L. Williams, D. F. Hochstrasser, From Proteins to Proteomes: Large Scale Protein Identification by Two-Dimensional Electrophoresis and Amino Acid Analysis. *Nat. Biotech.* **1996**, *14*, 61.
- [34] N. Zvonok, S. Yaddanapudi, J. Williams, S. Dai, K. Dong, T. Rejtar, B. L. Karger, A. Makriyannis, Comprehensive Proteomic Mass Spectrometric Characterization of Human Cannabinoid CB2 Receptor. *J. Proteome Res.* **2007**, *6*, 2068.
- [35] M. Karas, F. Hillenkamp, Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal. Chem.* **1988**, *60*, 2299.
- [36] a) J. Hemelaar, A. Borodovsky, B. M. Kessler, D. Reverter, J. Cook, N. Kolli, T. Gan-Erdene, K. D. Wilkinson, G. Gill, C. D. Lima, H. L. Ploegh, H. Ova, Specific and Covalent Targeting of Conjugating and Deconjugating Enzymes of Ubiquitin-Like Proteins. *Mol. Cell. Biol.* **2004**, *24*, 84; b) G. Blum, S. R. Mullins, K. Keren, M. Fonovic, C. Jedeszko, M. J. Rice, B. F. Sloane, M. Bogyo, Dynamic imaging of protease activity with fluorescently quenched activity-based probes. *Nat. Chem. Biol.* **2005**, *1*, 203; c) D. Heseck, M. Toth, S. O. Meroueh, S. Brown, H. Zhao, W. Sakr, R. Fridman, S. Mobashery, Design and Characterization of a Metalloproteinase Inhibitor-Tethered Resin for the Detection of Active MMPs in Biological Samples. *Chem. Biol.* **2006**, *13*, 379.

- [37] Introduction to Amine Modification in *Molecular Probes Handbook, A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies* (Ed.: I. S. Johnson, Michelle T. Z.), **2010**.
- [38] J. M. McFarland, M. B. Francis, Reductive Alkylation of Proteins Using Iridium Catalyzed Transfer Hydrogenation. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 13490.
- [39] C. Denison, Toward a General Chemical Method for Rapidly Mapping Multi-Protein Complexes. *J. Proteome Res.* **2004**, *3*, 417.
- [40] J. M. Antos, M. B. Francis, Selective Tryptophan Modification with Rhodium Carbenoids in Aqueous Solution. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 10256.
- [41] H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2004.
- [42] J. E. Moses, A. D. Moorhouse, The growing applications of click chemistry. *Chem. Soc. Rev.* **2007**, *36*, 1249.
- [43] M. L. Blackman, M. Royzen, J. M. Fox, Tetrazine Ligation: Fast Bioconjugation Based on Inverse-Electron-Demand Diels–Alder Reactivity. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 13518.
- [44] K. L. Kiick, E. Saxon, D. A. Tirrell, C. R. Bertozzi, Incorporation of azides into recombinant proteins for chemoselective modification by the Staudinger ligation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 19.
- [45] J. M. Chalker, C. S. C. Wood, B. G. Davis, A Convenient Catalyst for Aqueous and Protein Suzuki-Miyaura Cross-Coupling. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 16346.
- [46] Y. Takaoka, A. Ojida, I. Hamachi, Protein Organic Chemistry and Applications for Labeling and Engineering in Live-Cell Systems. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 4088.
- [47] a) J. Das, Aliphatic Diazirines as Photoaffinity Probes for Proteins: Recent Developments. *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 4405; b) S. G. Macdonald, J. J. Dumas, N. D. Boyd, Chemical Cross-Linking of the Substance P (NK-1) Receptor to the α Subunits of the G Proteins Gq and G11 \dagger . *Biochemistry* **1996**, *35*, 2909.
- [48] G. Chen, A. Heim, D. Riether, D. Yee, Y. Milgrom, M. A. Gawinowicz, D. Sames, Reactivity of Functional Groups on the

Protein Surface: Development of Epoxide Probes for Protein Labeling. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 8130.

- [49] a) V. Hong, N. F. Steinmetz, M. Manchester, M. G. Finn, Labeling Live Cells by Copper-Catalyzed Alkyne–Azide Click Chemistry. *Bioconjugate Chem.* **2010**, *21*, 1912; b) A. J. Link, D. A. Tirrell, Cell Surface Labeling of Escherichia coli via Copper(I)-Catalyzed [3+2] Cycloaddition. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 11164.
- [50] J. Gavriluk, H. Ban, M. Nagano, W. Hakamata, C. F. Barbas, Formylbenzene Diazonium Hexafluorophosphate Reagent for Tyrosine-Selective Modification of Proteins and the Introduction of a Bioorthogonal Aldehyde. *Bioconjugate Chem.* **2012**, *23*, 2321.
- [51] G. Espuña, G. Arsequell, G. Valencia, J. Barluenga, J. M. Alvarez-Gutiérrez, A. Ballesteros, J. M. González, Regioselective Postsynthetic Modification of Phenylalanine Side Chains of Peptides Leading to Uncommon ortho-Iodinated Analogues. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 325.
- [52] G. Espuña, D. Andreu, J. Barluenga, X. Pérez, A. Planas, G. Arsequell, G. Valencia, Iodination of Proteins by IPy2BF₄, a New Tool in Protein Chemistry†. *Biochemistry* **2006**, *45*, 5957.
- [53] D. N. Perkins, D. J. C. Pappin, D. M. Creasy, J. S. Cottrell, Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis* **1999**, *20*, 3551.
- [54] N. Jakubowski, J. Messerschmidt, M. G. Anorbe, L. Waentig, H. Hayen, P. H. Roos, Labelling of proteins by use of iodination and detection by ICP-MS. *J. Anal. Atom. Spectrom.* **2008**, *23*, 1487.
- [55] W. Humphrey, A. S. Dalke, K., VMD - Visual Molecular Dynamics. *J. Molec. Graphics* **1996**, *14*, 33.
- [56] V. Sarramegna, I. Muller, G. Mousseau, C. Froment, B. Monsarrat, A. Milon, F. Talmont, Solubilization, purification, and mass spectrometry analysis of the human mu-opioid receptor expressed in Pichia pastoris. *Protein Express. Purif.* **2005**, *43*, 85.
- [57] F. Talmont, G protein coupled receptors: accessing to 3-D structure. *Screening - Trends Drug Discov.* **2007**, *8*, 26.
- [58] F. Talmont, C. Mollereau, J.-M. Zajac, Expression of opioid and anti-opioid receptors in Chinese hamster ovary cells after exposure to dimethyl sulfoxide. *Anal. Biochem.* **2012**, *420*, 99.

- [59] R. B. Corley, *A Guide to Methods in the Biomedical Sciences*, Springer, **2005**.
- [60] P. K. Smith, R. I. Krohn, G. T. Hermanson, A. K. Mallia, F. H. Gartner, M. D. Provenzano, E. K. Fujimoto, N. M. Goeke, B. J. Olson, D. C. Klenk, Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* **1985**, *150*, 76.
- [61] a) K. H. Christoffers, H. Li, R. D. Howells, Purification and mass spectrometric analysis of the δ opioid receptor. *Mol. Brain. Res.* **2005**, *136*, 54; b) K. M. Wannermacher, A. Terskiy, S. Bian, P. N. Yadav, H. Li, R. D. Howells, Purification and mass spectrometric analysis of the κ opioid receptor. *Brain Res.* **2008**, *1230*, 13.
- [62] a) S. Filppula, S. Yaddanapudi, R. Mercier, W. Xu, S. Pavlopoulos, A. Makriyannis, Purification and mass spectroscopic analysis of human CB2 cannabinoid receptor expressed in the baculovirus system. *J. Pept. Res.* **2004**, *64*, 225; b) Z.-W. Chen, K. Fuchs, W. Sieghart, R. R. Townsend, A. S. Evers, Deep Amino Acid Sequencing of Native Brain GABAA Receptors Using High-Resolution Mass Spectrometry. *Mol. Cell. Proteomics* **2012**, *11*.
- [63] a) G. W. Pasternak, R. Goodman, S. H. Snyder, An endogenous morphine-like factor in mammalian brain. *Life Sci.* **1975**, *16*, 1765; b) L. Terenius, A. Wahlström, Search for an Endogenous Ligand for the Opiate Receptor. *Acta Physiol. Scand.* **1975**, *94*, 74.
- [64] J. Hughes, T. W. Smith, H. W. Kosterlitz, L. A. Fothergill, B. A. Morgan, H. R. Morris, Identification of two related pentapeptides from the brain with potent opiate agonist activity. *Nature* **1975**, *258*, 577.
- [65] A. Goldstein, S. Tachibana, L. I. Lowney, M. Hunkapiller, L. Hood, Dynorphin-(1-13), an extraordinarily potent opioid peptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1979**, *76*, 6666.
- [66] C. H. Li, D. Chung, Isolation and structure of an untrikontapeptide with opiate activity from camel pituitary glands. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1976**, *73*, 1145.
- [67] C. Chavkin, A. Goldstein, Specific receptor for the opioid peptide dynorphin: structure--activity relationships. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1981**, *78*, 6543.
- [68] I. Berezniuk, L. D. Fricker, Endogenous opioids in *The opiate receptors*, 2nd ed. (Ed.: G. W. Pasternak), Springer, New York, **2011**.

- [69] J. E. Zadina, L. Hackler, L.-J. Ge, A. J. Kastin, A potent and selective endogenous agonist for the [mu]-opiate receptor. *Nature* **1997**, *386*, 499.
- [70] G. Henderson, A. T. McKnight, The orphan opioid receptor and its endogenous ligand — nociceptin/orphanin FQ. *Trends Pharmacol. Sci.* **1997**, *18*, 293.
- [71] W. M. Pardridge, L. J. Mietus, Enkephalin and Blood-Brain Barrier: Studies of Binding and Degradation in Isolated Brain Micro vessels. *Endocrinology* **1981**, *109*, 1138.
- [72] a) S. Bajusz, A. Z. Rónai, J. I. Székely, L. Gráf, Z. Dunai-Kovács, I. Berzétei, A superactive antinociceptive pentapeptide, (D-Met²,Pro⁵)-enkephalinamide. *FEBS Lett.* **1977**, *76*, 91; b) B. Kane, B. Svensson, D. Ferguson, Molecular recognition of opioid receptor ligands. *AAPS J.* **2006**, *8*, E126; c) J. Aldrich, V. Kumar, B. Dattachowdhury, A. Peck, X. Wang, T. Murray, Solid Phase Synthesis and Application of Labeled Peptide Derivatives: Probes of Receptor-Opioid Peptide Interactions. *Int. J. Pept. Res. Ther.* **2008**, *14*, 315.
- [73] a) N. O. Elmagbari, R. D. Egleton, M. M. Palian, J. J. Lowery, W. R. Schmid, P. Davis, E. Navratilova, M. Dhanasekaran, C. M. Keyari, H. I. Yamamura, F. Porreca, V. J. Hruby, R. Polt, E. J. Bilsky, Antinociceptive Structure-Activity Studies with Enkephalin-Based Opioid Glycopeptides. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2004**, *311*, 290; b) Y. Li, M. R. Lefever, D. Muthu, J. M. Bidlack, E. J. Bilsky, R. Polt, Opioid glycopeptide analgesics derived from endogenous enkephalins and endorphins. *Future Med. Chem.* **2012**, *4*, 205; c) R. Polt, M. Dhanasekaran, C. M. Keyari, Glycosylated neuropeptides: A new vista for neuropsychopharmacology? *Med. Res. Rev.* **2005**, *25*, 557.
- [74] R. E. Rodriguez, F. D. Rodriguez, M. P. Sacristán, J. L. Torres, G. Valencia, J. M. Garcia Antón, New glycosylpeptides with high antinociceptive activity. *Neurosci. Lett.* **1989**, *101*, 89.
- [75] G. Arsequell, M. Salvatella, G. Valencia, A. Fernández-Mayoralas, M. Fontanella, C. Venturi, J. Jiménez-Barbero, E. Marrón, R. E. Rodríguez, Synthesis, conformation, and biological characterization of a sugar derivative of morphine that is a potent, long-lasting and nontolerant antinociceptive. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 2656.
- [76] a) G. P. Do Carmo, R. Polt, E. J. Bilsky, K. C. Rice, S. S. Negus, Behavioral Pharmacology of the μ/δ Opioid Glycopeptide

- MMP2200 in Rhesus Monkeys. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2008**, 326, 939; b) J. J. Lowery, T. J. Raymond, D. Giuvelis, J. M. Bidlack, R. Polt, E. J. Bilsky, In Vivo Characterization of MMP-2200, a Mixed δ/μ Opioid Agonist, in Mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2011**, 336, 767.
- [77] R. Egleton, T. Davis, Development of neuropeptide drugs that cross the blood-brain barrier. *Neurotherapeutics* **2005**, 2, 44.
- [78] M. A. A. Ibrahim, Molecular mechanical study of halogen bonding in drug discovery. *J. Comput. Chem.* **2011**, 32, 2564.
- [79] a) P. Auffinger, F. A. Hays, E. Westhof, P. S. Ho, Halogen bonds in biological molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, 101, 16789; b) R. Wilcken, M. O. Zimmermann, A. Lange, A. C. Joerger, F. M. Boeckler, Principles and Applications of Halogen Bonding in Medicinal Chemistry and Chemical Biology. *J. Med. Chem.* **2013**, 56, 1363.
- [80] A. R. Voth, P. Khuu, K. Oishi, P. S. Ho, Halogen bonds as orthogonal molecular interactions to hydrogen bonds. *Nat. Chem.* **2009**, 1, 74.
- [81] E. Parisini, P. Metrangolo, T. Pilati, G. Resnati, G. Terraneo, Halogen bonding in halocarbon-protein complexes: a structural survey. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, 40, 2267.
- [82] a) H. A. Bent, Structural chemistry of donor-acceptor interactions. *Chem. Rev.* **1968**, 68, 587; b) O. Hassel, Structural aspects of interatomic charge-transfer bonding. *Science* **1970**, 170, 497.
- [83] R. Wilcken, M. Zimmermann, A. Lange, S. Zahn, F. Boeckler, Using halogen bonds to address the protein backbone: a systematic evaluation. *J. Comput. Aided Mol. Des.* **2012**, 26, 935.
- [84] a) T. Clark, M. Hennemann, J. Murray, P. Politzer, Halogen bonding: the σ -hole. *J. Mol. Model.* **2007**, 13, 291; b) P. Politzer, J. S. Murray, T. Clark, Halogen bonding and other [sigma]-hole interactions: a perspective. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2013**, 15, 11178.
- [85] a) G. Toth, T. H. Kramer, R. Knapp, G. Lui, P. Davis, T. F. Burks, H. I. Yamamura, V. J. Hruby, [Cyclic] [D-Pen2,D-Pen5]enkephalin analogs with increased affinity and selectivity for δ -opioid receptors. *J. Med. Chem.* **1990**, 33, 249; b) C. L. Gentry, R. D. Egleton, T. Gillespie, T. J. Abbruscato, H. B. Bechowski, V. J. Hruby, T. P. Davis, The effect of halogenation on blood-brain

- barrier permeability of a novel peptide drug☆. *Peptides* **1999**, *20*, 1229.
- [86] Y. S. Lee, V. Kulkarani, S. M. Cowell, S.-w. Ma, P. Davis, K. E. Hanlon, T. W. Vanderah, J. Lai, F. Porreca, R. Vardanyan, V. J. Hruby, Development of Potent μ and δ Opioid Agonists with High Lipophilicity. *J. Med. Chem.* **2010**, *54*, 382.
- [87] W. König, R. Geiger, Eine neue Methode zur Synthese von Peptiden: Aktivierung der Carboxylgruppe mit Dicyclohexylcarbodiimid unter Zusatz von 1-Hydroxybenzotriazolen. *Chem. Ber.* **1970**, *103*, 788.
- [88] E. Frérot, J. Coste, A. Pantaloni, M.-N. Dufour, P. Jouin, PyBOP® and PyBroP: Two reagents for the difficult coupling of the α,α -dialkyl amino acid, Aib. *Tetrahedron* **1991**, *47*, 259.
- [89] E. Kaiser, R. L. Colescott, C. D. Bossinger, P. I. Cook, Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides. *Anal. Biochem.* **1970**, *34*, 595.
- [90] a) M. Meldal, in *Neoglycoconjugates: Preparation and Applications* (Ed.: Y. C. L. Lee, R.T.), Academic Press, Inc., San Diego, **1994**, p. 145; b) T. Buskas, S. Ingale, G.-J. Boons, Glycopeptides as versatile tools for glycobiology. *Glycobiology* **2006**, *16*, 113R.
- [91] L. A. Salvador, M. Elofsson, J. Kihlberg, Preparation of building blocks for glycopeptide synthesis by glycosylation of Fmoc amino acids having unprotected carboxyl groups. *Tetrahedron* **1995**, *51*, 5643.
- [92] L. K. Mydock, A. V. Demchenko, Mechanism of chemical O-glycosylation: from early studies to recent discoveries. *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 497.
- [93] a) G. Zemplén, A. Kunz, Studien über Amygdalin, IV: Synthese des natürlichen l-Amygdalins. *Ber. Deutsch. Chem. Ges.* **1924**, *57*, 1357; b) P. Sjölin, M. Elofsson, J. Kihlberg, Removal of Acyl Protective Groups from Glycopeptides: Base Does Not Epimerize Peptide Stereocenters, and β -Elimination Is Slow. *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 560.
- [94] V. Gonzalez-Nunez, R. E. Rodríguez, The Zebrafish: A Model to Study the Endogenous Mechanisms of Pain. *ILAR J.* **2009**, *50*, 373.
- [95] J. L. Torres, H. Pepermans, G. Valencia, F. Reig, J. M. Garcia-Anton, B. G. Van, Synthesis and conformational analysis of a

series of galactosyl enkephalin analogs showing high analgesic activity. *EMBO J.* **1989**, *8*, 2925.

- [96] B. O. Alén, L. Nieto, U. Gurriarán-Rodríguez, C. S. Mosteiro, J. C. Álvarez-Pérez, M. Otero-Alén, J. P. Camiña, R. Gallego, T. García-Caballero, M. Martín-Pastor, F. F. Casanueva, J. Jiménez-Barbero, Y. Pazos, The NMR Structure of Human Obestatin in Membrane-Like Environments: Insights into the Structure-Bioactivity Relationship of Obestatin. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e45434.
- [97] a) A. Keresztes, A. Borics, G. Tóth, Recent Advances in Endomorphin Engineering. *Chem. Med. Chem.* **2010**, *5*, 1176; b) R. Schwyzler, Molecular mechanism of opioid receptor selection. *Biochemistry* **1986**, *25*, 6335.
- [98] a) B. P. Roques, Novel approaches to targeting neuropeptide systems. *Trends Pharmacol. Sci.* **2000**, *21*, 475; b) F. Noble, B. P. Roques, Protection of endogenous enkephalin catabolism as natural approach to novel analgesic and antidepressant drugs. *Expert Opin. Ther. Targets* **2007**, *11*, 145; c) B. P. Roques, M.-C. Fournié-Zaluski, M. Wurm, Nouveaux analgésiques par complète inhibition de la dégradation enzymatique des opioïdes endogènes. *Med. Sci. (Paris)* **2012**, *28*, 476.
- [99] a) C. Oefner, A. D'Arcy, M. Hennig, F. K. Winkler, G. E. Dale, Structure of Human Neutral Endopeptidase (Neprilysin) Complexed with Phosphoramidon. *J. Mol. Biol.* **2000**, *296*, 341; b) Oefner, B. P. Roques, M. C. Fournie-Zaluski, G. E. Dale, Structural analysis of neprilysin with various specific and potent inhibitors. *Acta Crystallogr. D* **2004**, *60*, 392; c) C. Oefner, S. Pierau, H. Schulz, G. E. Dale, Structural studies of a bifunctional inhibitor of neprilysin and DPP-IV. *Acta Crystallogr. D* **2007**, *63*, 975; d) S. Sahli, B. Frank, W. B. Schweizer, F. Diederich, D. Blum-Kaelin, J. D. Aebi, H.-J. Böhm, C. Oefner, G. E. Dale, Second-Generation Inhibitors for the Metalloprotease Neprilysin Based on Bicyclic Heteroaromatic Scaffolds: Synthesis, Biological Activity, and X-Ray Crystal-Structure Analysis. *Helv. Chim. Acta* **2005**, *88*, 731.
- [100] a) K. Ito, Y. Nakajima, Y. Onohara, M. Takeo, K. Nakashima, F. Matsubara, T. Ito, T. Yoshimoto, Crystal Structure of Aminopeptidase N (Proteobacteria Alanyl Aminopeptidase) from *Escherichia coli* and Conformational Change of Methionine 260 Involved in Substrate Recognition. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 33664; b) M.-C. Fournié-Zaluski, H. Poras, B. P. Roques, Y. Nakajima, K. Ito, T. Yoshimoto, Structure of aminopeptidase N from *Escherichia coli* complexed with the transition-state analogue

aminophosphinic inhibitor PL250. *Acta Crystallogr. D* **2009**, *65*, 814.

- [101] S. A. Latt, B. Holmquist, B. L. Vallee, Thermolysin: A zinc metalloenzyme. *Biochem. Biophys. Res. Co.* **1969**, *37*, 333.
- [102] a) T. Komiyama, Inhibitory effect of phosphoramidon and its analogs on thermolysin. *Arch. Biochem. Biophys.* **1975**, *171*, 727; b) D. E. Tronrud, A. F. Monzingo, B. W. Matthews, Crystallographic structural analysis of phosphoramidates as inhibitors and transition-state analogs of thermolysin. *Eur. J. Biochem.* **1986**, *157*, 261; c) B. W. Matthews, Structural basis of the action of thermolysin and related zinc peptidases. *Acc. Chem. Res.* **1988**, *21*, 333; d) T. Hirakawa, S. Fujita, T. Ohyama, K. Dedachi, M. T. H. Khan, I. Sylte, N. Kurita, Specific interactions and binding energies between thermolysin and potent inhibitors: Molecular simulations based on ab initio molecular orbital method. *J. Mol. Graphics Model.* **2012**, *33*, 1.
- [103] G. P. Rossi, Dual ACE and NEP inhibitors: a review of the pharmacological properties of MDL 100240. *Cardiovasc. Drug Rev.* **2003**, *21*, 51.
- [104] a) B. P. Roques, F. Noble, V. Daugé, M. C. Fournie-Zaluski, A. Beaumont, Neutral endopeptidase 24.11: structure, inhibition, and experimental and clinical pharmacology. *Pharmacol. Rev.* **1993**, *45*, 87; b) B. P. Roques, Zinc metallopeptidases: active site structure and design of selective and mixed inhibitors: new approaches in the search for analgesics and antihypertensives. *Biochem. Soc. Trans.* **1993**, *21*, 678.
- [105] S. L. Roderick, M. C. Fournie-Zaluski, B. P. Roques, B. W. Matthews, Thiorphan and retro-thiorphan display equivalent interactions when bound to crystalline thermolysin. *Biochemistry* **1989**, *28*, 1493.
- [106] M.-C. Fournie-Zaluski, P. Chaillet, R. Bouboutou, A. Coulaud, P. Cherot, G. Waksman, J. Costentin, B. P. Roques, Analgesic effects of kelatorphan, a new highly potent inhibitor of multiple enkephalin degrading enzymes. *Eur. J. Pharmacol.* **1984**, *102*, 525.
- [107] a) E. M. Jutkiewicz, RB101-mediated Protection of Endogenous Opioids: Potential Therapeutic Utility? *CNS Drug Rev.* **2007**, *13*, 192; b) M. C. Fournie-Zaluski, P. Coric, S. Turcaud, E. Lucas, F. Noble, R. Maldonado, B. P. Roques, Mixed-inhibitor-prodrug as a

new approach toward systemically active inhibitors of enkephalin-degrading enzymes. *J. Med. Chem.* **1992**, 35, 2473.

- [108] a) H. Chen, F. Noble, A. Mothé, H. Meudal, P. Coric, S. Danascimento, B. P. Roques, P. George, M.-C. Fournié-Zaluski, Phosphinic Derivatives as New Dual Enkephalin-Degrading Enzyme Inhibitors: Synthesis, Biological Properties, and Antinociceptive Activities. *J. Med. Chem.* **2000**, 43, 1398; b) H. Chen, F. Noble, P. Coric, M.-C. Fournie-Zaluski, B. P. Roques, Aminophosphinic inhibitors as transition state analogues of enkephalin-degrading enzymes: A class of central analgesics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, 95, 12028.
- [109] a) K.-Y. Jung, H. D. Moon, G. E. Lee, H.-H. Lim, C.-S. Park, Y.-C. Kim, Structure-Activity Relationship Studies of Spinorphin as a Potent and Selective Human P2X₃ Receptor Antagonist. *J. Med. Chem.* **2007**, 50, 4543; b) K. Nishimura, T. Hazato, Isolation and Identification of an Endogenous Inhibitor of Enkephalin-Degrading Enzymes from Bovine Spinal Cord. *Biochem. Biophys. Res. Co.* **1993**, 194, 713.
- [110] C. Rougeot, M. Messaoudi, V. Hermitte, A. G. Rigault, T. Blisnick, C. Dugave, D. Desor, F. Rougeon, Sialorphin, a natural inhibitor of rat membrane-bound neutral endopeptidase that displays analgesic activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, 100, 8549.
- [111] Catherine Rougeot, Marie-Noelle Ungeheuer, Anne Wisner, Evelyne Dufour, Michaël Messaoudi, Amine Nejdi, A. Marcel, Human Opiorphin, a natural antinociceptive modulator of opioid-dependent pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, 103, 17979.
- [112] a) H. Javelot, M. Messaoudi, S. Garnier, C. Rougeot, Human Opiorphin Is A Naturally Occurring Antidepressant Acting Selectively On Enkephalin-Dependent-Opioid Pathways. *J. Physiol. Pharmacol.* **2010**, 61, 355; b) Q.-Z. Yang, S.-S. Lu, X.-Z. Tian, A.-M. Yang, W.-W. Ge, Q. Chen, The antidepressant-like effect of human opiorphin via opioid-dependent pathways in mice. *Neurosci. Lett.* **2011**, 489, 131.
- [113] T. Forster, Energiewanderung und Fluoreszenz. *Naturwissenschaften* **1946**, 33, 166.
- [114] R. M. Clegg, The history of FRET. in *Reviews in fluorescence*. (Eds.: C. D. Geddes, J. R. Lakowicz), Springer, New York, **2006**, p. 1.

- [115] L. Long, W. Lin, B. Chen, W. Gao, L. Yuan, Construction of a FRET-based ratiometric fluorescent thiol probe. *Chem. Commun.* **2011**, 47, 893.
- [116] a) E. D. Matayoshi, G. T. Wang, G. A. Krafft, J. Erickson, Novel fluorogenic substrates for assaying retroviral proteases by resonance energy transfer. . *Science* **1990**, 247, 954; b) K. Abid, B. Rochat, P. G. Lassahn, R. Stöcklin, S. Michalet, N. Brakch, J. F. Aubert, B. Vatansever, P. Tella, I. De Meester, E. Grouzmann, Kinetic study of neuropeptide Y (NPY) proteolysis in blood and identification of NPY3–35: a new peptide generated by plasma kallikrein. *J. Biol. Chem.* **2009**, 284, 24715.
- [117] C. Rougeot, Method for identifying BPLP and opiorphin agonists or antagonists. *PCT/EP2009/050567. WO/ 2009/090265*, **2009**.
- [118] M. A. Medeiros, M. S. França, G. Boileau, L. Juliano, K. M. Carvalho, Specific fluorogenic substrates for neprilysin (neutral endopeptidase, EC 3.4.24.11) which are highly resistant to serine- and metalloproteases. . *Braz. J. Med. Biol. Res.* **1997**, 30, 1157.
- [119] N. M. Barros, M. Campos, P. A. Bersanetti, V. Oliveira, M. A. Juliano, G. Boileau, L. Juliano, A. K. Carmona, Neprilysin carboxydipeptidase specificity studies and improvement in its detection with fluorescence energy transfer peptides. . *Biol. Chem.* **2007**, 388, 447.
- [120] a) R. Guerrini, G. Caló, R. Bigoni, D. Rizzi, A. Rizzi, M. Zucchini, K. Varani, E. Hashiba, D. G. Lambert, G. Toth, P. A. Borea, S. Salvadori, D. Regoli, Structure–activity studies of the Phe(4) residue of nociceptin(1–13)-NH(2): identification of highly potent agonists of the nociceptin/orphanin FQ receptor. . *J. Med. Chem.* **2011**, 44, 3956; b) X. Shao, Y. Gao, C. Zhu, X. Liu, J. Yao, Y. Cui, R. Wang, Conformational analysis of endomorphin-2 analogs with phenylalanine mimics by NMR and molecular modeling. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, 25, 3539.
- [121] A. E. Ruoho, H. Kiefer, P. E. Roeder, S. J. Singer, The Mechanism of Photoaffinity Labeling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1973**, 70, 2567.
- [122] M. J. Plevin, D. L. Bryce, J. Boisbouvier, Direct detection of CH/ π interactions in proteins. *Nat. Chem.* **2010**, 2, 466.
- [123] H. A. Scheraga, Predicting Three-Dimensional Structures of Oligopeptides in *Rev. Comp. Ch.*, John Wiley & Sons, Inc., **2007**, p. 73.

- [124] M. Filizola, N. B. Centeno, J. J. Perez, Computational Study of the Conformational Domains of Peptide T. *J. Pept. Sci.* **1997**, 3, 85.
- [125] a) G. V. Nikiforovich, Computational Molecular Modelling in Peptide Drug Design. *Int. J. Pept. Prot. Res.* **1994**, 44, 513; b) N. B. P. Centeno, J. J., A proposed bioactive conformation of Peptide T. *J. Comput. Aided Mol. Des.* **1998**, 12, 7; c) M. Filizola, O. Llorens, M. Cartení-Farina, J. J. Perez, New insights into the conformational requirements of B2 bradykinin antagonism. *Bioorg. Med. Chem.* **1998**, 6, 1491.
- [126] J. J. Perez, M. Sharkey, N. B. Centeno, On the bioactive Conformation of a Small Peptide and its Set of Thermodynamically Accessible Conformations. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **1996**, 2, 185.
- [127] U. K. Laemmli, Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* **1970**, 227, 680.

Annex

Articles 223

- Structure–Activity Relationship Study of Opiorphin,
a Human Dual Ectopeptidase Inhibitor with
Antinociceptive Properties
Journal of Medicinal Chemistry, 2012 225
- Proposed Bioactive Conformations of Opiorphin, an
Endogenous Dual APN/NEP Inhibitor
Medicinal Chemistry Letters, 2012 233

Pòsters 239

- Further SAR Studies on a Very Potent Opioid
Neoglycopeptide Related to Enkephalins
16th European Carbohydrate Symposium,
Sorrento (Itàlia) 2011 241
- Halogen Bonding for Improving
Opioid Receptor-Ligand Affinity
9th European Opioid Conference,
Guildford (Anglaterra) 2013 243
- Experimental and Computational Examination of
Ligand to Opioid Receptor Affinity Modulation Using
Halogen Bonding
*5th European Conference on Chemistry for Life
Sciences*, Barcelona (Espanya) 2013 245

Articles

Structure–Activity Relationship Study of Opiorphin, a Human Dual Ectopeptidase Inhibitor with Antinociceptive Properties

Mònica Rosa,[†] Gemma Arsequell,[†] Catherine Rougeot,[‡] Luis P. Calle,[§] Filipa Marcelo,[§] Marta Pinto,^{||} Nuria B. Centeno,^{||} Jesús Jiménez-Barbero,[§] and Gregorio Valencia^{*,†}[†]Institute of Advanced Chemistry of Catalonia (IQAC-CSIC), Barcelona, Spain[‡]Institut Pasteur-Unité de Biochimie Structurale et Cellulaire/URA2185—CNRS, Paris, France[§]Chemical and Physical Biology, Centro de Investigaciones Biológicas (CIB-CSIC), Madrid, Spain^{||}Computer-Assisted Drug Design Laboratory, Research Group on Biomedical Informatics (GRIB), IMIM-Universitat Pompeu Fabra, Barcelona, Spain

S Supporting Information

ABSTRACT: Toward developing new potential analgesics, this first structure–activity relationship study of opiorphin (H-Gln-Arg-Phe-Ser-Arg-OH), a human peptide inhibiting enkephalin degradation, was performed. A systematic Ala scanning proved that Phe³ is a key residue for neprilysin and aminopeptidase N (AP-N) ectoenkephalinase inhibition. A series of Phe³-halogenated analogues revealed that halogen bonding based optimization strategies are not applicable to this residue. Additional substituted Phe³ derivatives showed that replacing L-Phe³ for D-Phe³ increased the AP-N inhibition potency by 1 order of magnitude. NMR studies and molecular mechanics calculations indicated that the improved potency may be due to CH– π stacking interactions between the aromatic ring of D-Phe³ and the H γ protons of Arg². This structural motif is not possible for the native opiorphin and may be useful for the design of further potent and metabolically stable analogues.



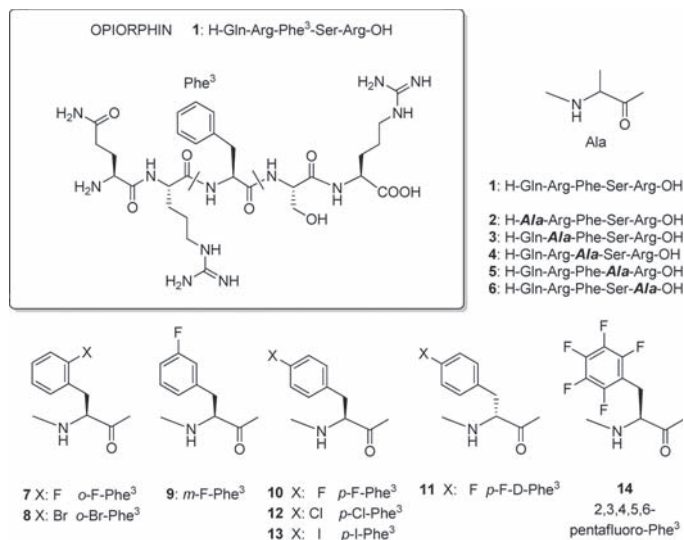
■ INTRODUCTION

The need for compounds with intermediate analgesic activity between nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and opioids has fueled the interest in enzyme inhibitors that protect endogenous opioid neuropeptides. One goal has been to potentiate the natural analgesic effect of the endogenous peptides Met- and Leu-enkephalin by inhibiting their enzymatic degradation. Owing to the complementary roles of both neprilysin [neutral endopeptidase (NEP), EC 3.4.24.11] and aminopeptidase N (AP-N; EC 3.4.11.2) in enkephalin inactivation, the design of dual inhibitors of these ectopeptidases seems an ideal approach.¹ Both NEP and AP-N are membrane-bound zinc metalloenzymes that belong to the M13 (NEP) and M1 (AP-N) peptidase families. Although they share a common catalytic domain, differences in the spatial arrangement of the catalytic residues and of their surroundings cause NEP to function as a carboxypeptidase that cleaves substrates at the N-terminal side of hydrophobic amino acids such as Phe, Leu, and Met, while AP-N releases the N-terminal amino acids from peptides that are not substituted α -amino acids. To date, both enzymes have escaped full experimental structural elucidation. Thus, the X-ray crystal structure of the extracellular domain (Asp52–Trp749) complexed with six different small-molecule inhibitors is the only structural information available for NEP.² Conversely, the structural

information available for AP-N is more limited and reduced to three X-ray crystal structures corresponding to complexes of a small-molecule inhibitor with an AP-N variant from *Escherichia coli*.³ Regrettably, human AP-N has an overall sequence identity of only 13.6% with the one from *E. coli*.^{3a} Even though homology models of human AP-N have been recently developed for designing nonpeptidic inhibitors, the authors accept that authentic structural information on the human variant would be necessary for building more accurate and useful models.⁴ In spite of these caveats, the analogies of the well-studied bacterial protease thermolysin with NEP have long been used for the early designs of selective as well as dual and transition-state inhibitors of NEP and AP-N using secondary structure prediction and molecular modeling algorithms.⁵ One of the first examples of such compounds is the selective NEP inhibitor thiorphan, which has led to drugs with antisecretory activity such as the antidiarrheal racecadotril (acetorphan).⁶ The difficulty in formulating a dual inhibitor arises from the obvious necessity to find optimal interactions for two zinc peptidases that, despite their similarity, show different specificities. Nevertheless, mixed inhibitory products such as RB101, which is prepared by covalently linking a potent AP-N

Received: September 13, 2011

Published: January 8, 2012

Scheme 1. Opiorphin, Ala Scan Opiorphin Analogues, and Halogenated [Phe³]-Opiorphin Analogues

with an NEP inhibitor, have been proposed.⁷ A further step in this process has been the design of single-molecule compounds such as RB3001 that are true dual inhibitors.⁸ Unfortunately, none of them have yet reached clinical applications in pain management.

This search for analgesics that modulate endogenous enkephalin circulating levels has received a new impulse due to the recent discovery and isolation from mammalian sources of the peptides spinorphin (LVVYPWT)⁹ and sialorphin (QHNP).¹⁰ These peptides, together with their human counterpart opiorphin (QRFSSR),¹¹ which was isolated from human saliva, act as endogenous NEP and AP-N inhibitors. It has been proved that opiorphin induces antinociceptive effects in various rodent models of morphine-sensitive pain by activating endogenous enkephalin-related opioid pathways, thus demonstrating that the natural catabolism of enkephalins is physiologically regulated.^{11,12} This, in turn, supports the therapeutic concept that analgesia may be amenable to enkephalin-induced potentiation by using molecules derived from naturally occurring peptides such as opiorphin.¹³ In a first exploration of this concept and toward the design of potential small-molecule peptidomimetic drugs, we have used a "ligand-based" approach to circumvent the lack of reliable structural information on these enzyme targets. Therefore, we here present our results on an Ala substitution scanning study that has revealed that Phe³ is a crucial residue for opiorphin inhibitory activity toward both NEP and AP-N ectoenzymes. This, in turn, prompted us to conduct the first SAR study of opiorphin that is focused on Phe³. The results show that halogen atoms placed at the aromatic function of Phe³ are not able to induce additional stabilizing interactions with either of the two enzymes by halogen bonding. Most notably, we have found that a D-Phe for L-Phe substitution induces a 1 order of magnitude increase in AP-N inhibition potency, which can be explained by CH- π stacking interactions between the aromatic ring of Phe³ and the H γ protons of Arg², as unveiled by NMR

conformational studies in solution and molecular mechanic calculations.

RESULTS AND DISCUSSION

To gain a first insight into the most influential residues in NEP and AP-N inhibitory activity of human opiorphin, five analogues corresponding to a traditional Ala scan were synthesized (Scheme 1). The resulting peptides, as well as the other peptide derivatives reported in this paper, were prepared by solid-phase peptide synthesis techniques using standard Fmoc protocols and purified by reversed-phase liquid chromatography using a VersaFlash flash chromatography system. All the compounds were evaluated for potential inhibitory activity in vitro using commercial recombinant human NEP and AP-N soluble enzymes and synthetic fluorogenic substrates.^{14–16} The monitoring of substrate hydrolysis in the presence of several concentrations of inhibitor provided kinetic plots such as those depicted in Figure 1 for the [Ala¹]-opiorphin analogue.

From these kinetic plots of enzyme inhibition, the corresponding dose-dependent inhibition curves were calculated for every compound and the two enzymes (Figure 2). Activity values expressed as EC₅₀ have been extrapolated for these curves. Compounds showing EC₅₀ values of over 100 μ M were considered inactive, and compounds showing EC₅₀ values over 70 μ M very poor inhibitors.

As seen in Table 1, all the Ala-substituted analogues were inferior dual inhibitors compared to the parent opiorphin. Only the Ala for Arg² substitution produced an analogue slightly more potent for NEP than the parent peptide, but it was almost inactive for AP-N. The most interesting compound is 4, which is a poor inhibitor for AP-N (IC₅₀ over 70 μ M) and is totally inactive against NEP (IC₅₀ over 100 μ M), conditions that are unique among the other compounds of Table 1. To us, 4 being the simultaneously least active compound of the series is a good indication of the relevant role played by the aromatic residue of Phe³ in the interactions of opiorphin with both its targets, NEP

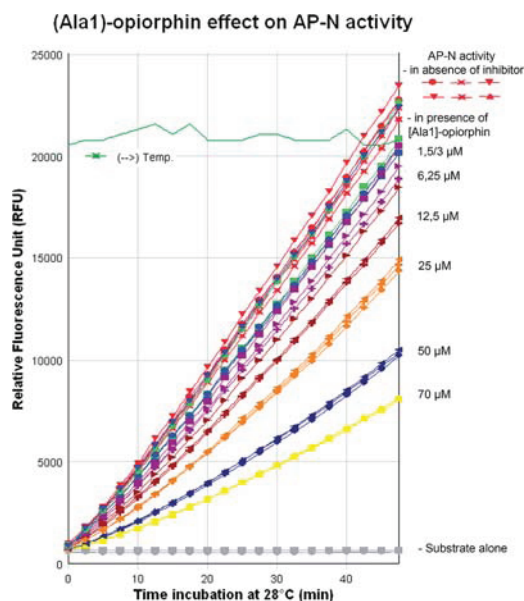


Figure 1. Fluorescence monitoring of Ala-MCA substrate hydrolysis by AP-N in the presence and absence of the [Ala¹]-opiophin analogue. According to the conditions of initial velocity measurement, the kinetics of appearance of the fluorescent signal (RFU) were directly proportional to the rate of hydrolysis of the substrates by AP-N. The background rate of substrate autolysis representing the fluorescent signal obtained in the absence of the enzyme was subtracted to calculate the initial velocities [RFU (relative fluorescent units)/min].

and AP-N, and therefore was considered a good target for an SAR study.

First, given the critical role of Phe³ in the inhibitory potency of opiophin toward NEP and AP-N, and that this aromatic side chain residue is a suitable structural motif for the introduction of halogen atoms, we sought to improve the inhibitory properties of opiophin by applying the halogen bonding rationale. This approach is based on the ability of halogen atoms to function as general, effective, and reliable sites for directing molecular recognition processes.¹⁷ The fact that about half of the molecules currently entering high-throughput screening tests are halogenated highlights the importance of this concept for drug design.¹⁸ Thus, a suitable set of commercial Phe building blocks with halogen atoms in their side chains were chosen and the corresponding opiophin analogues prepared and tested (Scheme 1).

As Table 2 reflects, none of the seven halogenated compounds assayed (7–13) were more potent dual NEP and AP-N inhibitors than the parent opiophin. Moreover, in the homologous series of halogenated analogues at the *para* position (10, 12, 13), activities did not gradually increase with the atomic weight of the halogen atom (F vs Cl vs I). A similar situation is suggested by the shortest *ortho*-halogenated series (7, 8) (F vs Br). This evidence supports that *ortho* and *para* halogenation of Phe³ does not generate new stabilizing interactions mediated by halogen bonds between opiophin and the two enzymes. Fluorination at *meta* (9) and perfluorination of Phe³ (14) totally prevent enzymatic inhibition.

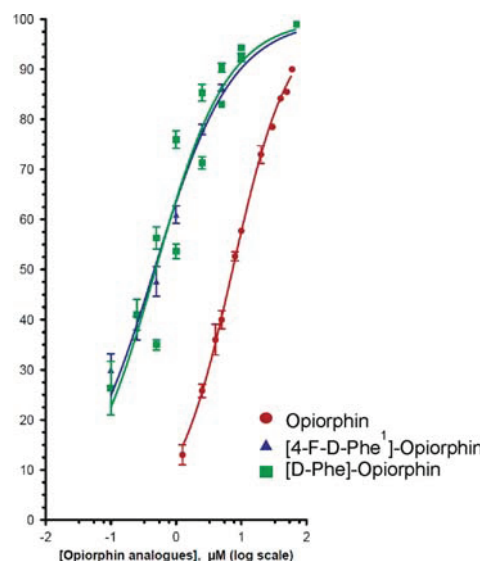


Figure 2. Dose-dependent inhibition by opiophin (1), [D-Phe¹]-opiophin (15), and [p-F-D-Phe¹]-opiophin (11) of Ala-MCA substrate hydrolysis by human AP-N. Each point represents the percentage of inhibition calculated as percentage of specific velocity without inhibitor – velocity in the presence of inhibitor/velocity without inhibitor. The opiophin analogue concentration (µM) is plotted on a log scale.

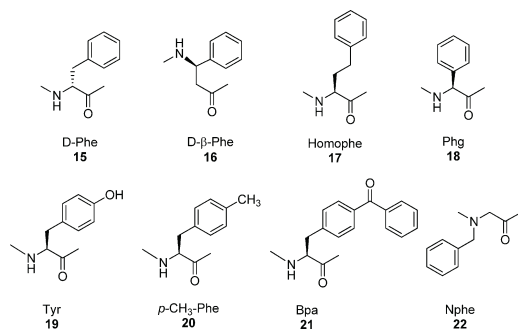
Table 1. Inhibition of hAP-N and hNEP Activities by Opiophin and Ala Analogues

peptide	compound	sequence	hAP-N IC ₅₀ ± SD (µM)	hNEP-endoP IC ₅₀ ± SD (µM)
1	opiophin	H-Gln-Arg-Phe-Ser-Arg-OH	8.1 ± 0.1	30 ± 3
2	[Ala ¹]-opiophin	H-Ala-Arg-Phe-Ser-Arg-OH	37 ± 3	>70
3	[Ala ²]-opiophin	H-Gln-Ala-Phe-Ser-Arg-OH	65 ± 3	12 ± 1
4	[Ala ³]-opiophin	H-Gln-Arg-Ala-Ser-Arg-OH	>70	≥100
5	[Ala ⁴]-opiophin	H-Gln-Arg-Phe-Ala-Arg-OH	47 ± 2	39 ± 2
6	[Ala ⁵]-opiophin	H-Gln-Arg-Phe-Ser-Ala-OH	>70	33 ± 2

To further examine the role of Phe³ in opiophin activity, a second series of analogues, in which Phe³ was substituted by Phe isomers, derivatives, and mimics that have been chosen because they are commonly used for SAR studies of other naturally occurring peptides^{19,20} and their corresponding building blocks are commercially available, were prepared and tested against both NEP and AP-N activities (Scheme 2). A further criterion for this selection was to preliminarily see if substitutions possibly leading to enzymatic resistance such as L by D and α by β changes on the configuration of this amino acid have an effect on the biological activity of opiophin. The Bpa

Table 2. Inhibition of hAP-N and hNEP Activities by Opiorphin and Halogenated Phe³ Analogues

peptide	name	compound	hAP-N IC ₅₀ ± SD (μM)	hNEP- endoP IC ₅₀ ± SD (μM)
1	opiorphin	H-Gln-Arg-Phe-Ser-Arg-OH	8.1 ± 0.1	30 ± 3
7	[<i>o</i> -F-Phe ³]-opiorphin	H-Gln-Arg-(<i>o</i> -F)-Phe-Ser-Arg-OH	44 ± 3	48 ± 3
8	[<i>o</i> -Br-Phe ³]-opiorphin	H-Gln-Arg-(<i>o</i> -Br)-Phe-Ser-Arg-OH	65 ± 4	30 ± 2
9	[<i>m</i> -F-Phe ³]-opiorphin	H-Gln-Arg-(<i>m</i> -F)-Phe-Ser-Arg-OH	>100	>100
10	[<i>p</i> -F-Phe ³]-opiorphin	H-Gln-Arg-(<i>p</i> -F)-Phe-Ser-Arg-OH	13.5 ± 0.5	>100
11	[<i>p</i> -D-Phe ³]-opiorphin	H-Gln-Arg-(<i>p</i> -D)-Phe-Ser-Arg-OH	0.5 ± 0.1	>100
12	[<i>p</i> -Cl-Phe ³]-opiorphin	H-Gln-Arg-(<i>p</i> -Cl)-Phe-Ser-Arg-OH	48 ± 5	70 ± 10
13	[<i>p</i> -I-Phe ³]-opiorphin	H-Gln-Arg-(<i>p</i> -I)-Phe-Ser-Arg-OH	30 ± 3	>100
14	[2,3,4,5,6-pentafluoro-Phe ³]-opiorphin	H-Gln-Arg-(2,3,4,5,6-pentafluoro)-Phe-Ser-Arg-OH	>>100	>100

Scheme 2. [Phe³]-Opiorphin Analogues

substitution (**21**) was screened in view of future photoaffinity labeling experiments.

As seen from their EC₅₀ values (Table 3), none of the eight compounds (**15**–**21**) are dual NEP and AP-N inhibitors. Also, small structural changes (i.e., Homophe, Phg, and Tyr for Phe³) (**17**, **18**, **19**) drastically affected NEP inhibition while still preserving some AP-N inhibition. The most notable finding was that [D-Phe³]-opiorphin is 1 order of magnitude more potent than opiorphin in AP-N inhibition. This substitution even tolerates *para* fluorination, as the resulting compound displays similar AP-N inhibitory potency.

To rationalize these observations from a structural perspective, solution NMR studies were then performed. Using standard 2D NMR methods, chemical shift assignments for the natural peptide opiorphin and for a subset of the analogues were collected (Table S2, Supporting Information). Analysis of these data mainly served to verify the different tendencies of natural [L-Phe³]-opiorphin with respect to its D-Phe³ analogue. On the other hand, no significant differences were appreciated between the fluorine-containing derivatives and the parent compound.

On a first inspection, the ¹H NMR spectra of the peptides containing D-Phe showed that the ¹H signals were more

Table 3. Inhibition of hAP-N and hNEP Activities by Opiorphin and Other Phe³ Analogues

	name	compound	hAP-N IC ₅₀ ± SD (μM)	hNEP-endoP IC ₅₀ ± SD (μM)
1	opiorphin	H-Gln-Arg-Phe-Ser-Arg-OH	8.1 ± 0.1	30 ± 3
15	[D-Phe ³]-opiorphin	H-Gln-Arg-D-Phe-Ser-Arg-OH	0.5 ± 0.1	>>100
11	[<i>p</i> -F-D-Phe ³]-opiorphin	H-Gln-Arg-(<i>p</i> -F)-D-Phe-Ser-Arg-OH	0.5 ± 0.1	>100
16	[D-β-Phe ³]-opiorphin	H-Gln-Arg-D-β-Phe-Ser-Arg-OH	>70	>>100
17	[Homophe ³]-opiorphin	H-Gln-Arg-Homophe-Ser-Arg-OH	54 ± 10	70 ± 10
18	[Phg ³]-opiorphin	H-Gln-Arg-Phg-Ser-Arg-OH	10 ± 3	>>100
19	[Tyr ³]-opiorphin	H-Gln-Arg-Tyr-Ser-Arg-OH	64 ± 5	70 ± 10
20	[<i>p</i> -Me-Phe ³]-opiorphin	H-Gln-Arg-(<i>p</i> -Me)-Phe-Ser-Arg-OH	45 ± 4	>100
21	[Bpa ³]-opiorphin	H-Gln-Arg-Bpa-Ser-Arg-OH	30 ± 3	>100
22	[Nphe ³]-opiorphin	H-Gln-Arg-Nphe-Ser-Arg-OH	>>100	>>100

dispersed than those containing the natural L-Phe residue. In a more quantitative analysis, the chemical shift indexes (CSIs)²¹ were calculated, which measure the deviation of the different backbone α protons (Hα) from the typical random coil values (Figure S1 and Table S3, Supporting Information). However, the most remarkable structural differences between the opiorphin analogues and the natural compound were observed when comparing the D-Phe versus L-Phe analogues due to the different β-sheet-forming propensity of Arg². The chemical-shift-based evidence for these differences was obtained by measuring the values of the key coupling constant ³J_{NH,Hα} for Arg² on these epimeric peptides. Thus, for instance, the value of ³J_{NH,Hα} measured for [p-F-Phe³]-opiorphin was 6.9 Hz, while for the corresponding [D-Phe³]-opiorphin analogue it decreased to 5.4 Hz. An additional difference concerning the Arg² residues was that the Hγ protons of the D-Phe peptides were significantly shielded with respect to their L-Phe³ counterparts (Table S1, Supporting Information). In particular, the R2 Hγ2 and Hγ3 protons of [p-F-D-Phe³]-opiorphin appeared shielded at a higher field, −0.38 and −0.52 ppm, respectively, than those of the L-Phe analogue ([p-F-Phe³]-opiorphin).

At this point, taking into account this experimental evidence, molecular mechanics calculations were performed to construct a 3D model. Thus, 3D structures for the natural opiorphin peptide and its corresponding [D-Phe³]-opiorphin analogue were generated by employing a conformational search protocol with Macromodel,²² as integrated in the Maestro package.²³ As expected from their small size, different minima were found for these two peptides. However, for the D-Phe³ derivative, the global minimum presented spatial proximity between the D-Phe³ aromatic ring and the Hγ protons of Arg², a fact that supports the experimental chemical shift evidence (Figure 3). This geometry is also in agreement with the experimental coupling constants that define the orientation of D-Phe³, that is, ³J_{Hα,Hβ2} and ³J_{Hα,Hβ3} (4.6 and 11.3 Hz, respectively). Only in this calculated orientation does the aromatic ring adopt the proper presentation to provide CH−π stacking interactions with the Hγ protons at the arginine side chain. The observed

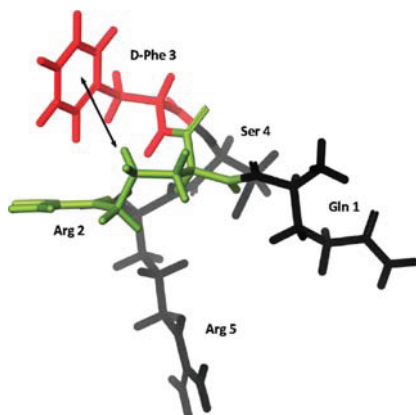


Figure 3. Model structure of the [D-Phe³]-opiorphin peptide (15) showing the eventual interaction between the H γ protons of Arg² (in green) and D-Phe³ (in red).

nuclear Overhauser effect (NOE) contacts also support the prevalent existence of this conformation, defined by a χ_1 (NH-C α -C β -C α) value of around -60° .

In contrast to the D-Phe³ analogue, key NMR experimental data such as coupling constants and NOEs for the native opiorphin are consistent with the existence of a different conformation for the corresponding side chain of Phe³, with a χ_1 (NH-C α -C β -C α) value of around 180° . Notably, this geometry does not allow the formation of CH- π stacking interactions with the H γ protons of Arg². According to molecular mechanics calculations, this undetected conformation, which would permit the π -cation, would be strongly destabilized in energy terms. Moreover, the expected $^3J_{\text{H}\alpha,\text{H}\beta 2}$ and $^3J_{\text{H}\alpha,\text{H}\beta 3}$ coupling constants for this geometry should have small values, in contrast with those observed experimentally (one small and one large value of 9.6 Hz, respectively).

Finally, the 3D structures that in our hands best fit the experimental NMR data for opiorphin and its corresponding D-Phe³ analogue are presented in Figure 4. These conformers were validated by the presence of a significant number of

experimental NOE contacts. In particular, the 3D structure proposed for the synthetic [D-Phe³]-opiorphin analogue satisfactorily explains three interresidual contacts (NH-F3/NH-S4, NH-R5/H β s-S4, and NH-F3/H β s-R2). In contrast, the NOE pattern observed for natural opiorphin permits the postulation of a different spatial orientation of these residues. The most noticeable differences between both molecules are observed for the NH-R5/H β s-S4 and NH-F3/NH-S4 NOEs. In summary, the different spatial architectures of these two peptides, which originate from the relative presentations of Arg² and Phe³ residues, translate into the rather distinct electrostatic potential energy surface plots of these molecules that may be at the origin of the differential properties discussed above.

CONCLUSIONS

An alanine scanning study of opiorphin has provided evidence that an Ala³ for Phe³ substitution produces the least active analogue, thus indicating the relevant role that this aromatic residue may play in opiorphin binding activity and specificity toward both targets, NEP and AP-N. In an attempt to apply the halogen bonding rationale to improve the biological properties of opiorphin through Phe³ halogenation, we found that *ortho* and *para* halogenation of the Phe³ aromatic ring does not result in opiorphin activity potentiation by new halogen bonding stabilizing interactions. Also, fluorination at *meta* and perfluorination completely block its enzyme inhibition activity. A further preparation of a series of substituted Phe³ derivatives has shown that substitution of L-Phe³ by D-Phe³ increases the AP-N inhibition potency of opiorphin by 1 order of magnitude while depleting its NEP inhibition activity. Comparative conformational studies in solution by NMR and molecular mechanics calculations have shown that the observed AP-N inhibition potency enhancement may be due to CH- π stacking interactions between the aromatic ring of Phe³ and the H γ protons of Arg², which can take place only in the D-Phe³ analogue. This first SAR study on opiorphin has failed to render a more potent opiorphin-based dual NEP and AP-N inhibitor but has identified a strategy to boost its AP-N inhibition potency by simultaneously providing analogues more metabolically stable than the native peptide.

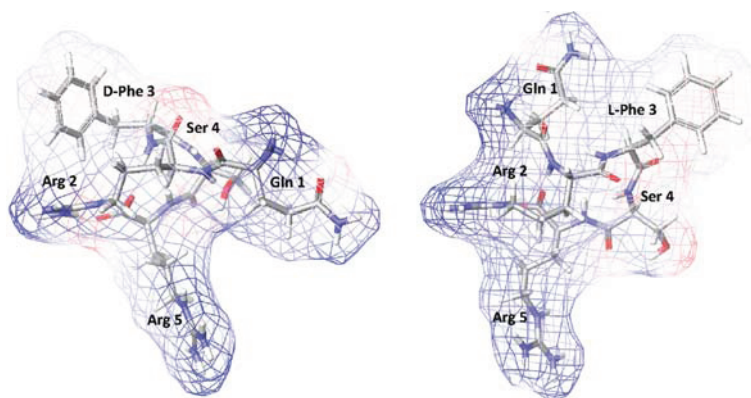


Figure 4. Electrostatic potential energy surface plots for the modified [D-Phe³]-opiorphin peptide (15) (left) and the natural opiorphin peptide (1) (right).

■ EXPERIMENTAL SECTION

Materials. All amino acid building blocks, coupling reagents, and derivatized resins (Fmoc-Ala Wang resin, Fmoc-Arg(Pmc) Wang resin) were purchased from Novabiochem AG. ACS grade organic solvents and other reagents such as sodium dodecyl sulfate- d_{25} were purchased from Sigma-Aldrich. All other reagents used were of analytical grade.

Peptide Synthesis. Opiorphin (1) and the peptide analogues 2–22 were synthesized manually by using standard N^{α} -Fmoc solid-phase methodology on either Fmoc-Ala-prederivatized Wang resin or Fmoc-Arg(Pmc)-prederivatized Wang resin.²⁴ N^{α} -Fmoc-protected amino acids (3 equiv) were used. The side chain protecting groups used to build the peptide sequences were the following: Trt for Gln and Asn, *t*-Bu for Ser and Thr, Boc for Lys, and Pmc for Arg. The Fmoc-Arg(Pmc) Wang resin (1 equiv) was placed in a glass peptide synthesis column with a frit on the bottom and swollen in DMF for 1 h. The amide couplings were effected by DIC (3 equiv) and HOBt (6 equiv). In the case of Fmoc-Gln(Trt)OH, couplings were effected using PyBOP (3 equiv), HOBt (3 equiv), and DIEA (6 equiv). Each coupling was performed manually in this peptide synthesis column using DMF as a solvent under reciprocal oscillating agitation. The coupling efficiencies were monitored by the Kaiser ninhydrin test. The Fmoc groups were removed with a solution of 20% piperidine in DMF (1 \times 9 min). The deprotected resin was washed with DMF, DCM, and then DMF. After assembly of the peptide sequence, a cocktail of TFA/TIS/H₂O (95:2.5:2.5) was used to remove the side chain protecting groups and to cleave the peptide from the resin. The crude peptides were precipitated with ice-cold *tert*-butyl methyl ether, filtered, redissolved in water, and lyophilized. The final peptides were purified on a reversed-phase (C-18) column with the VersaFlash flash chromatography system using a H₂O–ACN gradient. The homogeneity and identity of the final peptides were determined by analytical RP-HPLC and HRMS on a Waters UPLC-ESI/TOF system. All the obtained final peptides showed >98% purity. The purified peptides were characterized by high-resolution mass spectroscopy, TLC, analytical HPLC, and ¹H NMR (see the Supporting Information).

NMR Spectroscopy. All experiments were recorded in H₂O/D₂O (90:10) on a Bruker Avance 600 MHz instrument equipped with a triple-channel cryoprobe and at 278 K. NMR assignments were accomplished using standard 2D TOCSY experiments at different mixing times (20 and 60 ms) and 2D NOESY experiments (300 ms). The resonance of 2,2,3,3-tetradeuterio-3-(trimethylsilyl)propionic acid (TSP) was used as a chemical shift reference in the ¹H NMR experiments [δ (TSP) = 0 ppm].

Initial NMR experiments for the natural peptide opiorphin were carried out to optimize the experimental conditions. The same methodology was then applied to the other analogues containing Phe³ amino acid modifications.

Structure Determination. Molecular mechanics were conducted using MacroModel 9.6,²² as implemented in version 8.5.110 of the Maestro suite,²³ using OPLS-2005*²⁵ as the force field. The starting coordinates for conformational search calculations (OPLS-2005 as the force field) were those obtained after energy minimization for both L- and D-Phe³ analogues. The continuum GB/SA solvent model²⁶ was employed, and the general PRCG (Polak–Ribiere conjugate gradient) method for energy minimization was used. A conformational search protocol was then performed, using the Monte Carlo torsional sampling (MCMC) method, with the same force field and minimization conditions.

Determination of Biological Activities: Measurement of NEP and AP-N Activities Using Fluorimetric Assays. *Reagents.* Recombinant human NEP and human AP-N (devoid of their respective N-terminal cytosol and transmembrane segment) were purchased from R&D Systems and used as pure sources of ectopeptidases. Abz-dRGL(EDDnp) FRET peptide (Abz = *o*-aminobenzoic acid; EDDnp = *N*-(2,4-dinitrophenyl)ethylenediamine), that is, an internally quenched fluorescent substrate specific for NEP-endopeptidase activity, was synthesized by Thermo-Fisher Scientific

(Germany). Alanine-MCA (Ala-MCA), a fluorogenic substrate for measuring aminopeptidase activity, was purchased from Sigma.

Measurement of hNEP-Ectopeptidase Activity. Using a black half-area 96-well microplate, the standard reaction mixture consisted of the enzyme in 100 mM Tris–HCl, pH 7, containing 200 mM NaCl (100 μ L final volume). The substrate was added after preincubation for 10 min at 28 $^{\circ}$ C, and the kinetics of appearance of the fluorescent signal (RFU) were directly analyzed over 40 min at 28 $^{\circ}$ C using a fluorimeter microplate reader (monochromator Infinite 200-Tecan) at 320 and 420 nm excitation and emission wavelengths, respectively.

Measurement of hAP-N-Ectopeptidase Activity. The standard reaction mixture consisted of the enzyme in 100 mM Tris–HCl, pH 7.0 (100 μ L final volume). The Ala-MCA substrate was added after preincubation for 10 min at 28 $^{\circ}$ C, and the kinetics of appearance of the signal were monitored for 40 min at 28 $^{\circ}$ C by using the fluorimeter reader at 380 nm excitation and 460 nm emission wavelengths.

■ ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

¹H NMR, HRMS, FRET fluorescence monitoring, and NMR data of opiorphin and its corresponding analogues. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*Phone: +34934006113. Fax: +34 932045904. E-mail: gregorio.valencia@iqac.csic.es.

■ ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by a grant from the Fundació Marató de TV3 (Pain, Project Reference 070430-31-32-33). We thank F. J. Cañada for helpful discussions. J.J.-B. acknowledges financial support from the Ministerio de Ciencia e Innovación (Spain) (Grant CTQ2009-08536). F.M. thanks FCT-Portugal for a postdoctoral research grant (SFRH/BPD/65462/2009). M.R. acknowledges a fellowship (Grant AP2009-2534, Formación de Profesorado Universitario) from the Ministry of Education.

■ ABBREVIATIONS USED

Abz, *o*-aminobenzoic acid; β -D-Phe, (S)-3-amino-3-phenylpropionic acid or D- β -phenylalanine; Boc, *tert*-butoxycarbonyl; ACN, acetonitrile; Bpa, *p*-benzoylphenylalanine; CSI, chemical shift index; DCM, dichloromethane; DIC, *N,N*-diisopropylcarbodiimide; DIEA, *N,N*-diisopropylethylamine; DMF, *N,N*-dimethylformamide; Dnp, 2,4-dinitrophenyl; Fmoc, (fluorenylmethoxy)carbonyl; Fmoc-L-Ala Wang resin, N^{α} -Fmoc-L-alanine 4-(benzyloxy)benzyl ester polymer-bound; Fmoc-L-Arg(Pmc) Wang resin, N^{α} -Fmoc- N^{β} -Pmc-L-arginine 4-(benzyloxy)benzyl ester polymer-bound; hAP-N, human aminopeptidase N; hNEP, human neprilysin; Homophe, homophenylalanine; MCMC, Monte Carlo torsional sampling method; MCA, methoxycoumarin; NMR, nuclear magnetic resonance; Nphe, *N*-benzylglycine; NOESY, nuclear Overhauser enhancement spectroscopy; Phg, phenylglycine; Pmc, 2,2,5,7,8-pentamethylchroman-6-sulfonyl; PyBOP, (benzotriazol-1-yloxy)trispyrrolidinophosphonium hexafluorophosphate; rmsd, root-mean-square deviation; RFU, relative fluorescence unit; RP-LC, reversed-phase liquid chromatography (VersaFlash flash chromatography system); SAR, structure–activity relationship; SPPS, solid-phase peptide synthesis; *t*-Bu, *tert*-butyl; TFA, trifluoroacetic acid; TIS, triisopropylsilane;

TOCSY, total correlation spectroscopy; Trt, trityl; TSP, 2,2,3,3-tetradeuterio-3-(trimethylsilyl)propionic acid²⁷

REFERENCES

- (1) (a) Roques, B. P. Novel approaches to targeting neuropeptide systems. *Trends Pharmacol. Sci.* **2000**, *21*, 475–483. (b) Noble, F.; Roques, B. P. Protection of endogenous enkephalin catabolism as natural approach to novel analgesic and antidepressant drugs. *Expert Opin. Ther. Targets* **2007**, *11*, 145–159.
- (2) (a) Oefner, C.; D'Arcy, A.; Hennig, M.; Winkler, F. K.; Dale, G. E. Structure of human neutral endopeptidase (Neprilysin) complexed with phosphoramidon. *J. Mol. Biol.* **2000**, *296*, 341–349. (b) Oefner, C.; Roques, B. P.; Fournié-Zaluski, M. C.; Dale, G. E. Structural analysis of neprilysin with various specific and potent inhibitors. *Acta Crystallogr., D: Biol. Crystallogr.* **2004**, *60*, 392–396. (c) Oefner, C.; Pierau, S.; Schulz, H.; Dale, G. E. Structural studies of a bifunctional inhibitor of neprilysin and DPP-IV. *Acta Crystallogr., D: Biol. Crystallogr.* **2007**, *63*, 975–981. (d) Sahli, S.; Frank, B.; Schweizer, W. B.; Diederich, F.; Blum-Kaelin, D.; Aebi, J. D.; Böhm, H. J. Second-generation inhibitors for the metalloprotease neprilysin based on bicyclic heteroaromatic scaffolds: synthesis, biological activity, and X-ray crystal-structure analysis. *Helv. Chem. Acta* **2005**, *88*, 731–750.
- (3) (a) Ito, K.; Nakajima, Y.; Onohara, Y.; Takeo, M.; Nakashima, K.; Matsubara, F.; Ito, T.; Yoshimoto, T. Crystal structure of aminopeptidase N (proteobacteria alanyl aminopeptidase) from *Escherichia coli* and conformational change of methionine 260 involved in substrate recognition. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 33664–33676. (b) Fournié-Zaluski, M. C.; Poras, H.; Roques, B. P.; Nakajima, Y.; Ito, K.; Yoshimoto, T. Structure of aminopeptidase N from *Escherichia coli* complexed with the transition-state analogue aminophosphinic inhibitor PL250. *Acta Crystallogr., D: Biol. Crystallogr.* **2009**, *65*, 814–822.
- (4) Albrecht, S.; Al-Lakkis-Wehbe, M.; Orsini, A.; Defoin, A.; Pale, P.; Salomon, E.; Tarnus, C.; Weibel, J. M. Amino-benzosuberone: a novel warhead for selective inhibition of human aminopeptidase-N/CD13. *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 1434–1449.
- (5) (a) Matthews, B. W. Structural basis of thermolysin and related zinc peptidases. *Acc. Chem. Res.* **1988**, *21*, 333–340. (b) Roques, B. P. Zinc metallopeptidases: active site structure and design of selective and mixed inhibitors—new approaches in the search for analgesics and antihypertensives. *Biochem. Soc. Trans.* **1999**, *21*, 678–685. (c) Roques, B. P.; Noble, F.; Daugé, V.; Fournié-Zaluski, M. C.; Beaumont, A. Neutral endopeptidase 24.11: structure, inhibition, and experimental and clinical pharmacology. *Pharmacol. Rev.* **1993**, *45*, 87–146.
- (6) (a) Matheson, A. J.; Noble, S. Racecadotril. *Drugs* **2000**, *59*, 829–835. (b) Spillantini, M. G.; Geppetti, P.; Fanciullacci, M.; Michelacci, S.; Lecomte, J. M.; Sicuteri, F. *In vivo* 'enkephalinase' inhibition by acetorphan in human plasma and CSF. *Eur. J. Pharmacol.* **1986**, *125*, 147–150. (c) Reggiani, A.; Carenzi, A.; Frigeni, V.; Della Bella, D. Effect of bestatin and thiorphan on [Met⁵]enkephalin-Arg⁶-Phe⁷-induced analgesia. *Eur. J. Pharmacol.* **1984**, *105*, 361–364.
- (7) (a) Jutkiewicz, E. M. RB101-mediated protection of endogenous opioids: potential therapeutic utility? *CNS Drug Rev.* **2007**, *13*, 192–205. (b) Fournié-Zaluski, M. C.; Coric, P.; Turcaud, S.; Lucas, E.; Noble, F.; Maldonado, R.; Roques, B. P. "Mixed inhibitor—prodrug" as a new approach toward systemically active inhibitors of enkephalin-degrading enzymes. *J. Med. Chem.* **1992**, *35*, 2474–2481. (c) Roques, B. P.; Noble, F.; Daugé, V.; Fournié-Zaluski, M. C.; Beaumont, A. Neutral endopeptidase 24.11: structure, inhibition, and experimental and clinical pharmacology. *Pharmacol. Rev.* **1993**, *45*, 87–146.
- (8) (a) Chen, H.; Noble, F.; Mothé, A.; Meudal, H.; Coric, P.; Danascimento, S.; Roques, B. P.; George, P.; Fournié-Zaluski, M. C. Phosphinic derivatives as new dual enkephalin degrading enzyme inhibitors: synthesis, biological properties, and antinociceptive activities. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 1398–1408. (b) Chen, H.; Noble, F.; Coric, P.; Fournie-Zaluski, M. C.; Roques, B. P. Aminophosphinic inhibitors as transition state analogues of enkephalin-degrading enzymes: a new class of central analgesics. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1998**, *95*, 12028–12033.
- (9) (a) Yamamoto, Y.; Ono, H.; Ueda, A.; Shimamura, M.; Nishimura, K.; Hazato, T. Spinorphin as an endogenous inhibitor of enkephalin-degrading enzymes: roles in pain and inflammation. *Curr. Protein Pept. Sci.* **2002**, *3*, 587–599. (b) Nishimura, K.; Hazato, T. Isolation and identification of an endogenous inhibitor of enkephalin-degrading enzymes from bovine spinal cord. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1993**, *194*, 713–719.
- (10) Rougeot, C.; Messaoudi, M.; Hermitte, V.; Rigault, A. G.; Blisnick, T.; Dugave, C.; Desor, D.; Rougeon, F. Sialorphan, a natural inhibitor of rat membrane-bound neutral endopeptidase that displays analgesic activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2003**, *100*, 8549–8554.
- (11) Wisner, A.; Dufour, E.; Messaoudi, M.; Nejd, A.; Marcel, A.; Ungeheuer, M. N.; Rougeot, C. Human opiorphin, a natural antinociceptive modulator of opioid-dependent pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2006**, *103*, 17979–17984.
- (12) (a) Tian, X. Z.; Chen, J.; Xiong, W.; He, T.; Chen, Q. Effects and underlying mechanisms of human opiorphin on colonic motility and nociception in mice. *Peptides* **2009**, *30*, 1348–1354. (b) Rougeot, C.; Robert, F.; Menz, L.; Bisson, J. F.; Messaoudi, S. Systemically active human opiorphin is a potent yet non-addictive analgesic without drug tolerance effects. *J. Physiol. Pharmacol.* **2010**, *61*, 483–490. (c) Javelot, H. M.; Messaoudi, S.; Garnier, S.; Rougeot, C. Human opiorphin is a naturally occurring antidepressant acting selectively on enkephalin-dependent delta-opioid pathways. *J. Physiol. Pharmacol.* **2010**, *61*, 355–362. (d) Yang, Q. Z.; Lu, S. S.; Tian, X. Z.; Yang, A. M.; Ge, W. W.; Chen, Q. The antidepressant-like effect of human opiorphin via opioid-dependent pathways in mice. *Neurosci. Lett.* **2011**, *489*, 131–135.
- (13) Rougeot, C. Opiorphin peptide derivatives as potent inhibitors of enkephalin-degrading ectopeptidases. PCT/EP2009/054171, April 4, 2009; WO/2009/124948, Oct 15, 2009.
- (14) (a) Medeiros, M. A.; França, M. S.; Boileau, G.; Juliano, L.; Carvalho, K. M. Specific fluorogenic substrates for neprilysin (neutral endopeptidase, EC 3.4.24.11) which are highly resistant to serine- and metalloproteases. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **1997**, *30*, 1157–1162. (b) Barros, N. M.; Campos, M.; Bersanetti, P. A.; Oliveira, V.; Juliano, M. A.; Boileau, G.; Juliano, L.; Carmona, A. K. Neprilysin carboxydeipeptidase specificity studies and improvement in its detection with fluorescence energy transfer peptides. *Biol. Chem.* **2007**, *388*, 447–455.
- (15) Rougeot, C. Method for identifying BPLP and opiorphin agonists or antagonists. PCT/EP2009/050567, Jan 19, 2009; WO/2009/090265, July 23, 2009.
- (16) (a) Mantle, D.; Hardy, M. F.; Lauffart, B.; McDermott, J. R.; Smith, A. I.; Pennington, R. J. Purification and characterization of the major aminopeptidase from human skeletal muscle. *Biochem. J.* **1983**, *211*, 567–573. (b) Abid, K.; Rochat, B.; Lassahn, P. G.; Stöcklin, R.; Michalek, S.; Brakch, N.; Aubert, J. F.; Vatansever, B.; Tella, P.; De Meester, I.; Grouzmann, E. Kinetic study of neuropeptide Y (NPY) proteolysis in blood and identification of NPY3–35: a new peptide generated by plasma kallikrein. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 24715–24724.
- (17) (a) Parisini, E.; Metrangola, P.; Pilati, T.; Resnati, G.; Terraneo, G. Halogen bonding in halocarbon-protein complexes: a structural survey. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 2267–227. (b) Hardegger, L. A.; Kuhn, B.; Spinnler, B.; Anselm, L.; Ecabert, R.; Stihle, M.; Gsell, B.; Thoma, R.; Diez, J.; Benz, J.; Plancher, J. M.; Hartmann, G.; Banner, D. W.; Haap, W.; Diederich, F. Systematic investigation of halogen bonding in protein-ligand interactions. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2011**, *50*, 314–318.
- (18) Ibrahim, M. A. Molecular mechanical study of halogen bonding in drug discovery. *J. Comput. Chem.* **2011**, *32*, 2564–2574.
- (19) Guerrini, R.; Caló, G.; Bigoni, R.; Rizzi, D.; Rizzi, A.; Zucchini, M.; Varani, K.; Hashiba, E.; Lambert, D. G.; Toth, G.; Borea, P. A.; Salvadori, S.; Regoli, D. Structure–activity studies of the Phe(4) residue of nociceptin(1–13)-NH(2): identification of highly potent agonists of the nociceptin/orphanin FQ receptor. *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 3956–3964.
- (20) Shao, X.; Gao, Y.; Zhu, C.; Liu, X.; Yao, J.; Cui, Y.; Wang, R. Conformational analysis of endomorphin-2 analogs with phenylalanine

mimics by NMR and molecular modeling. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 3539–3547.

(21) Wishart, D. S.; Bigam, C. G.; Holm, A.; Hodges, R. S.; Sykes, B. D. ^1H , ^{13}C and ^{15}N random coil NMR chemical shifts of the common amino acids. I. Investigations of nearest-neighbor effects. *J. Biomol. NMR* **1995**, *5*, 67–81.

(22) *MacroModel*, version 9.6; Schrödinger, LLC: New York, 2008.

(23) *Maestro, a Powerful All-Purpose Molecular Modeling Environment*, version 8.5; Schrödinger, LLC: New York, 2008.

(24) Chan, W. C.; White, P. D. In *Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach*; Chan, W.C., White, P.D., Eds.; Oxford University Press: Oxford, U.K., 2000; pp 41–76.

(25) Jorgensen, W. L.; Maxwell, D. S.; Tirado-Rives, J. Development and testing of the OPLS all-atom force field on conformational energetics and properties of organic liquids. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 11225–11236.

(26) Still, W. C.; Tempczyk, A.; Hawley, R. C.; Hendrickson, T.. Semianalytical treatment of solvation for molecular mechanics and dynamics. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 6127–6129.

(27) Abbreviations used for amino acids and designation of peptides follow the rules of the IUPAC-IUB Commission of Biochemical Nomenclature in *J. Biol. Chem.* **1972**, *247*, 977–983.

Proposed Bioactive Conformations of Opiorphin, an Endogenous Dual APN/NEP Inhibitor

Marta Pinto,[†] Catherine Rougeot,[‡] Luis Gracia,[§] Mònica Rosa,^{||} Andrés García,[†] Gemma Arsequell,^{||} Gregorio Valencia,^{||} and Nuria B. Centeno^{*,†}

[†]Computer-Assisted Drug Design Laboratory, Research Programme on Biomedical Informatics (GRIB), IMIM-Universitat Pompeu Fabra, Dr. Aiguader 88, E-08003 Barcelona, Spain

[‡]Institut Pasteur–Unité de Biochimie Structurale et Cellulaire/URA2185–CNRS, 25 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15, France

[§]Department of Physiology and Biophysics, Weill Cornell Medical College, 1300 York Avenue, New York, New York 10065, United States

^{||}Unit of Glycoconjugate Chemistry, Instituto de Química Avanzada de Catalunya (IQAC–CSIC), Jordi Girona 18-26, E-08034 Barcelona, Spain

S Supporting Information

ABSTRACT: The conformational profiles for the endogenous peptide Opiorphin and a set of seven analogues exhibiting different inhibitory activities toward human aminopeptidase N (hAPN) and human neprilysin (hNEP) were independently computed to deduce a bioactive conformation that Opiorphin may adopt when binding these two enzymes. The conformational space was thoroughly sampled using an iterative simulated annealing protocol, and a library of low-energy conformers was generated for each peptide. Bioactive Opiorphin conformations fitting our experimental structure–activity relationship data were identified for hAPN and hNEP using computational pairwise comparisons between each of the unique low-energy conformations of Opiorphin and its analogues. The obtained results provide a structural explanation for the dual hAPN and hNEP inhibitory activity of Opiorphin and show that the inborn flexibility of Opiorphin is essential for its analgesic activity.

KEYWORDS: Opiorphin, bioactive conformation, conformational analysis



One approach in the search of new analgesic compounds relies on the potentiation of the enkephalins' action by using small-molecule inhibitors of their catabolism. The targets of this long-pursued drug discovery concept are the enkephalin-degrading ectoenzymes aminopeptidase N (APN, EC 3.4.11.2) and neprilysin (NEP, EC 3.4.24.11), and up to now, several dual inhibitors have been developed.¹ A new opportunity has arisen after the discovery and characterization of Opiorphin, a human endogenous pentapeptide (QRFSR) secreted in saliva, which is able to bind and inhibit both human aminopeptidase N (hAPN) and human neprilysin (hNEP) *in vitro*. The compound is also active *in vivo*, showing a pain-suppressive potency similar to morphine in the formalin pin-pain and tail-flick behavioral rat pain models.^{2,3}

As a preliminary step toward the design of potential small-molecule peptidomimetic drugs based on the Opiorphin structure, we have undertaken a computational study to deduce the conformation(s) that enable Opiorphin to inhibit two different enzymes such as hAPN and hNEP. Depending on the availability of the structural information about the target and/or the ligand, computer-assisted drug design studies currently rely on either “structure” or “ligand-based” approaches.⁴ In our case, the structure of the extracellular domain of hNEP complexed with six different inhibitors is available (PDB entries: 1DMT, 1RIH, 1RII, 1RIJ, 1Y8J, and 2QPJ)^{5–8} and has led to the

development of novel nonpeptidic hNEP inhibitors.^{9–11} Conversely, structural information on APN is constrained to the *Escherichia coli* APN structure complexed with three inhibitors (PDB entries: 2DQM, 2ZXG, and 3KED).^{12,13} Unfortunately, hAPN has an overall sequence identity of only 13.6% with its *E. coli* orthologue,¹² thus limiting its usefulness in structure-based approaches.¹⁴ Being a small peptide, Opiorphin is a highly flexible molecule, whose conformations have not been previously studied in either solution or the solid state. Because of this lack of structural information on Opiorphin, we have decided to use a ligand-based approach to computationally characterize its bioactive conformation. Our approach involves two steps: (i) sampling the conformational space of Opiorphin and a set of analogues, including active and inactive compounds, and (ii) a comparative conformational analysis among the low-energy conformation libraries of the parent compound and of this set of analogues, taking into account their activity at each target (hAPN and hNEP).

Given the high number of allowed bond rotations in peptides, efficient sampling methods are always needed to compute a library of accessible conformations. Here, we have

Received: June 14, 2011

Accepted: November 17, 2011

Published: November 17, 2011

Table 1. In Vitro Activity of Opiorphin and a Set of Different Analogues against hNEP and hAPN^a

peptide	name	sequence	IC ₅₀ (μ M)	
			hAPN	hNEP
1	Opiorphin	Q R F S R	8 \pm 1	30 \pm 3
2	Opiorphin-(3–5)	F S R	120 ^b	7 ^b
3	Opiorphin-(2–5)	R F S R	27 ^b	\sim 180 ^b
4	Opiorphin-(1–4)	Q R F S	75 ^b	\gg 100 ^b
5	[Asn ¹]-Opiorphin	N R F S R	\gg 100	\sim 130
6	[Thr ⁴]-Opiorphin	Q R F T R	\gg 100	\gg 100
7	[Phe ⁶]-Opiorphin	F Q R F S R	122	51 \pm 7
8	[Cys ⁶]-Opiorphin	C Q R F S R	0.8 \pm 0.1 ^b	7 \pm 3 ^b

^aPeptides in *italics* are new measurements (see the text for details). ^bRef 25.

used an iterative simulated annealing protocol, which was originally developed by one of us,¹⁵ and has been tested in various peptides ranging from 2 to 11 residues.^{16–19} The protocol has been recently upgraded to enhance efficiency and automation by an in-house-developed program (see the Supporting Information for details).

Briefly, starting zwitterionic structures were generated in their extended conformation using the all-atom ff03 force field with an implicit solvent as implemented in AMBER10. For each peptide, the initial structure was energy minimized and subsequently heated to 900 K using a fast heat rate of 100 K/ps to force the structure to jump among different regions of the conformational space. The resulting high-energy structure was then slowly cooled to 200 K at a cool rate of 7 K/ps. The so-obtained structure was used as a starting point for a new SA cycle. After each cycle, low-temperature structures were minimized before being added to a library of low-energy conformations for further analysis. The procedure is repeated until no new conformations, excluding those that are local reoptimizations of the side chains, appear after 300 cycles within a 5 kcal/mol energy range with respect to the lowest energy structure already found. A conformation was considered unique if at least one of the backbone dihedral angles (except the first and the last) differs by more than 60° as compared to any of the previous obtained structures (see the Supporting Information for more details).

The subsequent comparative conformational analysis of the peptide low-energy conformation libraries thus obtained uses a methodology that we and others have previously used satisfactorily to elucidate the bioactive conformations of peptides.^{20–22} This analysis is based on the paradigm that the bioactive conformer is one among the set of thermodynamically accessible conformations,²³ which will show up in the group of conformations common to all of the analogues that are efficient binders. Furthermore, inactive analogues will not be able to attain the bioactive conformation or have/lack some structural feature(s) that inactivate them.

In the present paper, we have applied this methodology to Opiorphin and a set of analogues (Table 1); some of them have already been described in two patents.^{24,25} To do so, peptides 1 and 5–7 were synthesized, and their in vitro inhibitory activity against hAPN and hNEP was assessed (see the Supporting Information for experimental details). For hAPN, peptides 1, 3, and 8 make the group of active compounds (IC₅₀ < 50 μ M), while 2 and 4–7 are considered inactive (IC₅₀ > 70 μ M). In the case of hNEP, good binders are peptides 1, 2, 7, and 8, while nonbinders are 3–6. Only two compounds, Opiorphin and analogue 8, are considered true in vitro dual inhibitors of hAPN and hNEP.

The conformational landscape of Opiorphin and seven analogues was first sampled using the iterative simulated annealing protocol (see the Supporting Information for details). For Opiorphin, this required 9251 cycles of iterative simulated annealing, yielding a library of 28 unique low-energy conformations. Next, each of the seven low-energy conformation libraries obtained for the analogues were compared with the one of Opiorphin. The analysis was independently performed for the two targets since the activity displayed by the different analogues against the two enzymes is different (see Figure S1 in the Supporting Information). Low-energy conformation libraries of active or good binding analogues were first compared to reduce the number of conformation candidates from 28 to 6 in the case of hAPN and from 28 to 3 for hNEP. Further comparison with the inactive or nonbinding analogue libraries allowed arrival at one and two candidate conformations for hAPN and hNEP, respectively.

By the above comparative conformational analysis, it was found that Opiorphin shares six very close low-energy conformations with hAPN active analogues 3 and 8. However, only one of them is able to explain the inactivity of peptide 5 and was therefore selected as our proposed bioactive conformation for hAPN.

The proposed bioactive conformation of Opiorphin for hAPN is depicted in Figure 1. It displays a distorted C shape

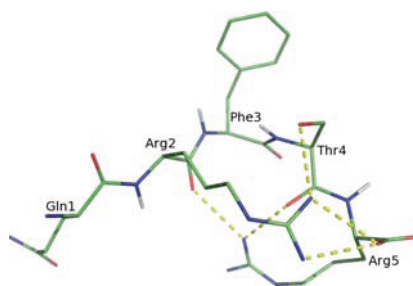


Figure 1. Representation of the 3D structure of our proposed bioactive conformation for Opiorphin hAPN inhibition. Intramolecular hydrogen bonds are indicated by dashes. Hydrogen atoms of side chains have been omitted for clarity.

and is highly stabilized by five intramolecular hydrogen bonds. All backbone atoms, except those of Ser⁴ and the carbonyl oxygen of Arg², are surface-exposed, and they can freely interact with hAPN. Conversely, it seems that the main role of the Arg², Ser⁴, and Arg⁵ side chains may be to maintain the bioactive

conformation. The Gln¹ side chain does not have a role in the stabilization of the bioactive conformation since it is exposed to the surface, but also, it does not make any key interaction with APN, since the activity is still retained by deletion of this residue (peptide 3). The substitution of Gln¹ by Asn produced peptide 5, which is not able to adopt the bioactive conformation, probably because changes in this side chain may influence the Arg² backbone, which seems to be a key residue, as suggested by the inactivity of peptide 2. From this proposed bioactive conformation, it can be hypothesized that Phe³ may mediate crucial interactions with hAPN because it is completely surface-exposed and therefore arranged to make appropriate interactions with the enzyme. The substitution of the Ser⁴ by Thr also yields an inactive compound (peptide 6), which is able to adopt the bioactive conformation. However, the close vicinity of the Thr methyl group with the side chain of Phe³ induces conformational changes (see Figure S2 in the Supporting Information), which could prevent its interaction with the enzyme, thus reinforcing the hypothesis of the key role of Phe³ side chain for APN inhibition. As mentioned before, the main role of Arg⁵ may be to maintain the bioactive conformation. Accordingly, the bioactive conformation was not found in the low-energy conformation library of peptide 4. Although the RFS sequence looks very important for activity, the existence of extra space in the binding pocket makes it possible to accommodate longer peptides such as active peptide 8. The nature and volume of this additional residue are also important determinants of activity (peptide 8 vs 7).

In the case of hNEP, we found three common conformations for active peptides 2, 7, and 8 and the parent compound. One of them was eliminated because it was also common to inactive analogue peptide 3. Further comparisons with inactive analogues 5 and 6 did not allow us to unambiguously select which of the two remaining candidate conformations (1.1 and 1.17) is the bioactive one (1 stands for Opiorphin, and the second number is its position in the low-energy conformation library). One of the main differences between these candidates is the dihedral angle φ for Ser⁴ (175.84° vs -14.38°), which produces a change in the shape of the FSR part of the peptide (see Figure S3 in the Supporting Information).

At this stage, we decided to take into account the structural data available for other hNEP inhibitors. Of particular interest were the bioactive conformations of five dipeptide derivatives (RDF⁵, BIR⁶, OIR⁶, TI1⁶, and I20⁸) that had been obtained by X-ray crystallography. All of them exhibited the same conformation at the C-terminal moiety, which is very close to the FSR fragment of conformation 1.17, and accordingly, we selected it as our proposed bioactive conformation for hNEP (see the Supporting Information for more details).

This conformation has a distorted S shape, and it is highly stabilized by three hydrogen bonds, plus a salt bridge formed between the C-terminal carboxylate and the side chain of Arg² (Figure 2). In this conformation, most of the backbone atoms, as well as the side chains of Phe³, Ser⁴, and Arg⁵, are exposed to the surface, where they become available to make appropriate interactions with the enzyme. On the other hand, the side chains of Gln¹, Arg², and Arg⁵ are involved in intrapeptide hydrogen bonds, which stabilize the bioactive conformation. Nevertheless, the role of Arg² is not essential, as demonstrated by the fact that the FSR peptide retains activity (peptide 2). The hydrogen bond between the nitrogen side chain of Gln¹ and the carbonyl oxygen of Phe³ seems to play a critical role in the 3D architecture of the bioactive conformation for active

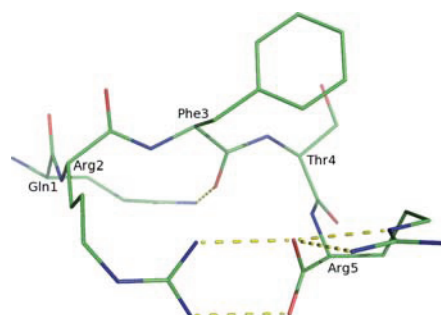


Figure 2. Representation of the 3D structure of our proposed bioactive conformation for Opiorphin hNEP inhibition. Intramolecular hydrogen bonds are indicated by dashes. Hydrogen atoms of side chains have been omitted for clarity.

peptides 1, 7, and 8, stabilizing the backbone conformation of the FSR moiety. Accordingly, the deletion of the Gln¹ (peptide 3) and even the substitution of Gln by Asn (peptide 5) yield inactive compounds, which are not able to adopt the bioactive conformation. The hydroxyl group of the Ser⁴ residue does not play any critical role in the stabilization of the putative bioactive conformation of Opiorphin for hNEP. However, replacement of this residue by Thr results in inactivity (peptide 6). Because our proposed bioactive conformation was not found in its low-energy conformation library, it seems that the presence of an additional methyl group destabilizes the backbone of the bioactive conformation. Removal of the Arg⁵ residue also yields an inactive analogue (peptide 4). The inability of this peptide to reach the bioactive conformation shows the critical role of this C-terminal residue in the Opiorphin 3D spatial arrangement when interacting with hNEP. In addition, taking into account the carboxydipeptidase nature of NEP, it is likely that this may be due to its backbone atoms, rather than to its side chain. Accordingly, the most important structural feature in the bioactive conformation of Opiorphin looks like the backbone conformation of FSR sequence. Therefore, the activity of deletion peptide analogues seems to depend primarily on their ability to preserve the backbone conformation of these three C-terminal residues.

The C- and S-shaped conformations of Opiorphin that we propose as bioactive conformations for hAPN and hNEP, respectively, look rather unrelated. Their superimposition along the peptide backbone shows an rmsd of 2.24 Å that confirms their poor similarities (Figure 3). Such differences between them reflect the distinct three-dimensional arrangements of catalytic functions at both binding sites.

hNEP and hAPN are membrane-bound zinc metalloproteases that belong to different families: hNEP is an M13 peptidase, while hAPN is an M1 peptidase. Although they share a common catalytic pattern, differences in the spatial arrangement of the binding site make NEP function as a carboxydipeptidase that cleaves substrates at the N-terminal side of hydrophobic residues such as Phe, Leu, and Met,²⁶ while making APN release the N-terminal amino acid from peptide substrates that are not substituted α -amino acids.²⁷ Our results are in accordance with the logical fact that a single conformation of Opiorphin could not simultaneously fulfill the requirements of both enzymes. Being an endogenous peptide, Opiorphin has most probably been naturally optimized

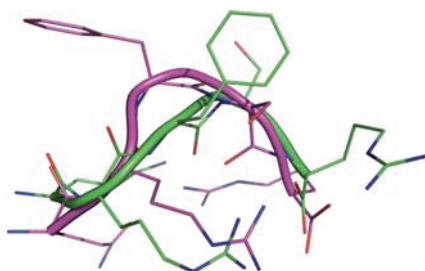


Figure 3. Superposition of backbone atoms of hAPN (magenta) and hNEP (green) proposed bioactive conformations. To highlight the overall shape differences, backbone atoms are shown as cartoons. Hydrogen atoms of side chains have been omitted for clarity.

to fulfill the spatial requirements of such structurally different binding sites. This is well reflected in the series presented in this study, where only [Cys]⁰-Opiorphin retains dual activity, and any other modification abolishes at least one inhibitory activity.

In conclusion, our study reveals that instead of a common conformation of Opiorphin for the inhibition of both targets, two different bioactive conformations, one for each target, provide an adequate explanation of the SAR data observed in this series of Opiorphin's analogues. Such conformations explain the dual inhibitory activity of Opiorphin at a molecular level, which is the result of its inborn flexibility, and emphasizes the complexity of designing dual-acting NEP/APN nonpeptide inhibitors based on Opiorphin. Further investigation into the pharmacophore model based on these proposed bioactive conformations of Opiorphin is ongoing and will be reported in due course.

■ ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

Experimental and computational methodological details, conformational search data (Table S2), workflow used to elucidate the bioactive conformations for hANP and hNEP (Figure S1), comparison of bioactive conformation for APN common to Opiorphin and [Thr]⁴-Opiorphin (Figure S2), candidates for NEP bioactive conformation found by comparative conformational analysis (Figure S3), and details of the peptide-NEP complexes comparison with putative Opiorphin bioactive conformation candidates as a tool for choosing the most likely Opiorphin bioactive conformation for NEP (with Scheme S1 and Figures S4–S5). This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*E-mail: nuria.centeno@upf.edu.

Funding

These studies have been supported by the Fundació Marató de TV3 (project number 070433).

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ REFERENCES

- (1) Thanawala, V.; Kadam, V. J.; Ghosh, R. Enkephalinase Inhibitors: Potential agents for the management of pain. *Curr. Drug Targets* **2008**, *9*, 887–894.
- (2) Wisner, A.; Dufour, E.; Messaoudi, M.; Nejdi, A.; Marcel, A.; Ungeheuer, M. N.; Rougeot, C. Human Opiorphin, a natural antinociceptive modulator of opioid-dependent pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2006**, *103*, 17979–17984.
- (3) Rougeot, C.; Robert, F.; Menz, L.; Bisson, J. F.; Messaoudi, M. Systemically active human Opiorphin is a potent yet non-addictive analgesic without drug tolerance effects. *J. Physiol. Pharmacol.* **2010**, *61*, 483–490.
- (4) Leach, A. R.; Gillet, V. J.; Lewis, R. A.; Taylor, R. Three-dimensional pharmacophore methods in drug discovery. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 539–558.
- (5) Oefner, C.; D'Arcy, A.; Hennig, M.; Winkler, F. K.; Dale, G. E. Structure of human neutral endopeptidase (Neprilysin) complexed with phosphoramidon. *J. Mol. Biol.* **2000**, *296*, 341–349.
- (6) Oefner, C.; Roques, B. P.; Fournié-Zaluski, M. C.; Dale, G. E. Structural analysis of neprilysin with various specific and potent inhibitors. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **2004**, *60*, 392–396.
- (7) Oefner, C.; Pierau, S.; Schulz, H.; Dale, G. E. Structural studies of a bifunctional inhibitor of neprilysin and DPP-IV. *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **2007**, *63*, 975–981.
- (8) Sahli, S.; Frank, B.; Schweizer, W. B.; Diederich, F.; Blum-Kaelin, D.; Aebi, J. D.; Böhm, H. J. Second-generation inhibitors for the metalloprotease neprilysin based on bicyclic heteroaromatic scaffolds: Synthesis, biological activity, and X-ray crystal-structure analysis. *Helv. Chem. Acta* **2005**, *88*, 731–750.
- (9) Inguibert, N.; Poras, H.; Dhotel, H.; Beslot, F.; Scalbert, E.; Bennejean, C.; Renard, P.; Fournié-Zaluski, M. C.; Roques, B. P. In vivo properties of thiol inhibitors of the three vasopeptidases NEP, ACE and ECE are improved by introduction of a 7-azatryptophan in P2' position. *J. Pept. Res.* **2004**, *63*, 99–107.
- (10) Pryde, D. C.; Maw, G. N.; Planken, S.; Platts, M. Y.; Sanderson, V.; Corless, M.; Stobie, A.; Barber, C. G.; Russell, R.; Foster, L.; Barker, L.; Wayman, C.; Van Der Graaf, P.; Stacey, P.; Morren, D.; Kohl, C.; Beaumont, K.; Coggon, S.; Tute, M. Novel selective inhibitors of neutral endopeptidase for the treatment of female sexual arousal disorder. Synthesis and activity of functionalized glutaramides. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 4409–4424.
- (11) Dimitropoulos, N.; Papakyriakou, A.; Dalkas, G. A.; Sturrock, E. D.; Spyroulias, G. A. A computational approach to the study of the binding mode of dual ACE/NEP inhibitors. *J. Chem. Inf. Model.* **2010**, *50*, 388–396.
- (12) Ito, K.; Nakajima, Y.; Onohara, Y.; Takeo, M.; Nakashima, K.; Matsubara, F.; Ito, T.; Yoshimoto, T. Crystal structure of aminopeptidase N (proteobacteria alanyl aminopeptidase) from *Escherichia coli* and conformational change of methionine 260 involved in substrate recognition. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 33664–33676.
- (13) Fournié-Zaluski, M. C.; Poras, H.; Roques, B. P.; Nakajima, Y.; Ito, K.; Yoshimoto, T. Structure of aminopeptidase N from *Escherichia coli* complexed with the transition-state analogue aminophosphinic inhibitor PL250. *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **2009**, *65*, 814–822.
- (14) Centeno, N. B.; Planas-Iglesias, J.; Oliva, B. Comparative modelling of protein structure and its impact on microbial cell factories. *Microb. Cell Fact.* **2005**, *4*, 20.
- (15) Filizola, M.; Centeno, N. B.; Perez, J. J. Computational Study of the Conformational Domains of Peptide T. *J. Pept. Sci.* **1997**, *3*, 85–92.
- (16) Filizola, M.; Carteni-Farina, M.; Perez, J. J. Conformational study of vasoactive intestinal peptide by computational methods. *J. Pept. Res.* **1997**, *50*, 55–64.
- (17) Filizola, M.; Centeno, N. B.; Carteni-Farina, M.; Perez, J. J. Conformational Analysis of the Highly Potent Bradykinin Antagonist Hoe-140 by Means of Two Different Computational Methods. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **1998**, *4*, 639–652.
- (18) Corcho, F. J.; Canto, J.; Perez, J. J. Comparative analysis of the conformational profile of substance P using simulated annealing and molecular dynamics. *J. Comput. Chem.* **2004**, *25*, 1937–1952.

- (19) Bisetty, K.; Corcho, F. J.; Canto, J.; Kruger, H. G.; Perez, J. J. A theoretical study of pentacyclo-undecane cage peptides of the type [Ac-X-Y-NHMe]. *J. Pept. Sci.* **2006**, *12*, 92–105.
- (20) Nikiforovich, G. V. Computational Molecular Modelling in Peptide Drug Design. *Int. J. Pept. Prot. Res.* **1994**, *44*, 513–531.
- (21) Centeno, N. B.; Perez, J. J. A proposed bioactive conformation of Peptide T. *J. Comput.-Aided Mol. Des.* **1998**, *12*, 7–14.
- (22) Filizola, M.; Llorens, O.; Carteni-Farina, M.; Perez, J. J. New insights into the conformational requirements of B2 bradykinin antagonism. *Bioorg. Med. Chem.* **1998**, *6*, 1491–1500.
- (23) Perez, J. J.; Sharkey, M.; Centeno, N. B. On the bioactive Conformation of a Small Peptide and its Set of Thermodynamically Accessible Conformations. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **1996**, *2*, 185–191.
- (24) Rougeot, C. Method for identifying Opiorphin agonists or antagonists. WO 090265, 2009.
- (25) Rougeot, C. Opiorphin peptide derivatives as potent inhibitors of enkephalin-degrading ectopeptidases. WO 124948, 2009.
- (26) Roques, B. P.; Noble, F.; Dauge, V.; Fournié-Zaluski, M. C.; Beaumont, A. Neutral endopeptidase 24.11: Structure, inhibition, and experimental and clinical pharmacology. *Pharmacol. Rev.* **1993**, *45*, 87–146.
- (27) Wachsmuth, E. D.; Fritze, I.; Pfeleiderer, G. An aminopeptidase occurring in pig kidney. I. An improved method of preparation. Physical and enzymic properties. *Biochemistry* **1966**, *5*, 169–174.

Pòsters

FURTHER SAR STUDIES ON A VERY POTENT OPIOID NEOGLYCOPEPTIDE RELATED TO ENKEPHALINS

Gemma Arsequell¹, Mònica Rosa¹, Verónica González-Núñez², Katherine Barreto-Valer², Filipa Marcelo³, Luis P. Calle³, Raquel E. Rodríguez², Jesús Jiménez-Barbero³, Gregorio Valencia¹

¹Institute of Advanced Chemistry of Catalonia - Spanish National Research Council (IQAC-CSIC), Barcelona (Spain); ²Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Medicine, Institute of Neuroscience of Castilla y León (INCyL), University of Salamanca (Spain); ³Chemical and Physical Biology, Biological Research Centre, (CIB-CSIC), Madrid (Spain).

Introduction:

It is known that conjugation of certain opioid ligands to simple sugars endorse them with desirable biochemical and biodistribution properties¹.

In past studies, we revealed that the introduction of β -Glc and β -Gal by O-glycosylation to the 5-position of the H-Tyr-D-Met-Gly-Phe-Pro-NH₂ enkephalin sequence greatly improved its analgesic activity in animal models of pain.²

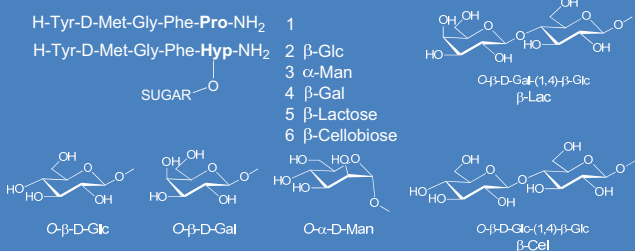
Also, the Gal analogue was always more potent than the Glc³. More recently, we have prepared a α -Man derivative of morphine which has also shown remarkable antinociceptive properties⁴. We have tried to correlate their activities with their conformational behavior in solution.

OBJECTIVES

- Determinate correlation between binding constants of the glycopeptides to opioid receptors and the *in vivo* activities previously reported.
- Investigate the conformational behavior in solution of the **glycopeptides** and the parent peptide.
- Explore the mannosylation effect in the activity of H-Tyr-D-Met-Gly-Phe-Pro-NH₂ as in morphine.
- Study the effect of glycosylation on the peptide activity by disaccharides (Lac and Cel).

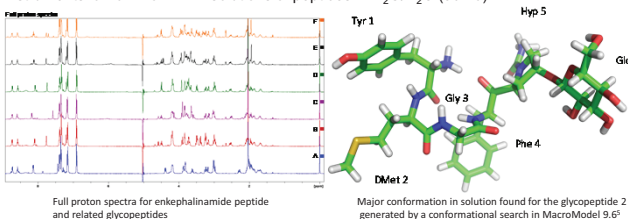
TARGET GLYCOPEPTIDES

The five neoglycopeptides (2-6) depicted and their parent compound (1) were prepared by stepwise solid-phase peptide synthesis following standard Fmoc protocols and using previously synthesized glycoamino acid building blocks.



STRUCTURAL STUDIES: NMR

NMR conformational studies in aqueous (and membrane model media) have also been conducted to assess the effects of the sugar moieties on the peptide structure. NMR assignments were accomplished using standard 2D TOCSY (mixing times 20 and 60 ms) and 2D-NOESY (300 ms) experiments on Bruker Avance 600 MHz and 800 MHz instruments ran on 1 or 2 mM solutions of peptides in H₂O/D₂O (90:10).

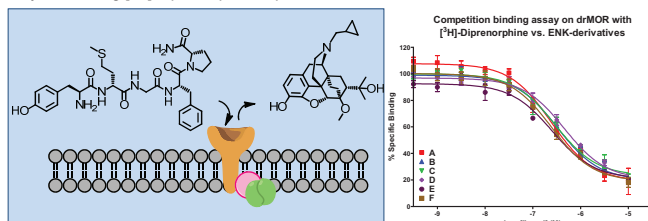


REFERENCES

1. Pölt R, Dhanasekaran M, Keyari CM. *Med. Res. Rev.* **2005**, 25, 557-85.
2. Bajusz S., Ronai A.Z., Székely J.L., Graf L., Dunai-Kovacs Z., Berzéti I. *FEBS Lett.*, **1977**, 76, 91-93.
3. Rodríguez R.E., Rodríguez F.D., Sacristán M.P., Torres J.L., Valencia G., García Antón J.M. *Neuroscience Lett.*, **1989**, 101, 89-94.
4. Arsequell G.; Salvatella M., Valencia G., Fernández-Mayoralas A., Fontanella M., Venturi Ch., Jiménez-Barbero J., Marrón E., Rodríguez R.E. *J. Med. Chem.* **2009**, 52, 2656-2666.
5. MacroModel, version 9.6, Schrödinger, LLC, New York, **2008**

BIOLOGICAL ACTIVITY

The binding affinity of the peptides for the δ and μ zebrafish cloned opioid receptors in human stably transfected HEK-293 cells have been assessed by measuring [³H]-diprenorphin displacement.



Glycopeptides	drMOR (μ) K_i (nM)	drDOR1 (δ_1) K_i (nM)	drDOR2 (δ_2) K_i (nM)
1	269.0 \pm 49.0	441.6 \pm 126.1	256.4 \pm 39.4
2 β -D-Glc	312.6 \pm 67.6	389.5 \pm 118.8	158.9 \pm 18.9
3 α -D-Man	336.1 \pm 99.0	608.6 \pm 58.4	442.8 \pm 93.4
4 β -D-Gal	383.3 \pm 57.1	488.2 \pm 105.0	402.6 \pm 118.2
5 β -Lac	202.5 \pm 3.7	829.8 \pm 205.2	457.2 \pm 102.3
6 β -Cel	223.1 \pm 24.8	697.9 \pm 160.0	424.0 \pm 104.7
Morphine*	202	223	1400
Met-ENK*	680	—	45

*Gonzalez-Nunez V, Rodriguez RE. The zebrafish: a model to study the endogenous mechanisms of pain. *JLAR J.* **2009**, 50, 373-86.

CONCLUSIONS

1. No major conformation changes could be observed along the series suggesting that the saccharide part of the molecules do not establish strong interactions with the peptidic part.
2. All the glycopeptides and the parent peptide have affinities on the same order of magnitude for the three opioid receptors with a weak selectivity for drMOR. This affinity for drMOR is similar to that of morphine and Met-enkephalin.
3. Small differences of affinity in the series suggest that the carbohydrate moiety plays a minor role in the binding events. However:
 - a) Monosaccharide conjugation decreases the affinity for the three OR types except for an slightly increase for the glucose derivative at drDOR2.
 - b) The affinity differences induced by disaccharide conjugation are not statistically significant.
 - c) Most remarkably, these minor differences of affinity values between the series do not account for the important *in vivo* activity differences we had reported that, in the best case, are of 57.000 times in favor of Gal *versus* Glc.

GLYCOBIOLOGY

gemma.arsequell@iqac.csic.es
gregorio.valencia@iqac.csic.es

This research is supported by a grant from Fundació Marató TV3 (070430/31/32/33)

Fundació
La Marató de TV3

HALOGEN BONDING FOR IMPROVING OPIOID RECEPTOR-LIGAND AFFINITY

M. Rosa¹, G. Arsequell¹, V. González-Núñez², K. Barreto-Valer², R. E. Rodríguez², G. Valencia¹

¹Institute of Advanced Chemistry of Catalonia (IQAC-CSIC), Barcelona (Spain)

²Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Medicine, Instituto de Neurociencias de Castilla y León (INCYL), University of Salamanca (Spain)

INTRODUCTION

Nowadays, half of molecules entering high throughput screening tests contain halogen atoms.¹ The introduction of those halogens on ligands could improve their activity by generating new molecular recognition sites,² so steric hindrance competes *versus* those new interactions called halogen bonds.^{3,4} These halogen bonds may offer new and versatile tools for the design of ligands as drugs. Two series of halogenated analogs of Leu-Enkephalin (H-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-OH) and Endomorphin-1 (H-Tyr-Pro-Trp-Phe-OH) were synthesized and their *in vitro* activities were evaluated towards μ (MOR), δ_1 (DOR1) and δ_2 (DOR2) zebrafish opioid receptors to determine the presence and effect on affinity of halogen bonding between these ligands and Opioid Receptors.

HALOGEN BONDING EFFECT

Usually, when introducing a bigger atom on a well fitted ligand, the affinity falls down due to steric hindrance following the succession (F/H/Cl/Br/I). In several cases, introducing bigger halogens, there is an affinity improvement due to new interactions that are made by those halogens. These electrostatic interactions between halogens and an acceptor in a specific angle are called halogen bonds.⁵ Experimentally, if halogen bonding is achieved, affinity improvements could be observed by a decrease of the K_i value.

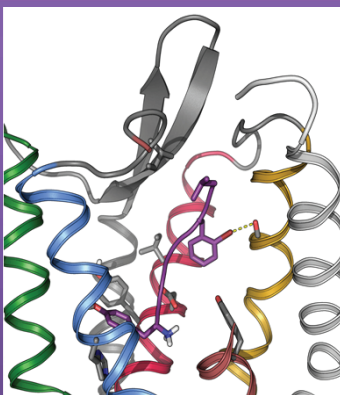


Figure 1. Halogen bonding interaction between δ -opioid receptor and [2-Br-Phe⁴]-LeuENK

Computational model made by Dr. Gianluigi Callabiano from the Biochemical Unit of Autonomous University of Barcelona (UAB)

OBJECTIVES

- Synthesis of halogenated Leu-Enkephalin and Endomorphin families
- Determine the effect on *in vitro* affinities of the halogenated compounds
- Analyze data to correlate possible halogen bonding effect vs. steric hindrance

HALOGENATED NEUROPEPTIDES

The halogenated peptide families depicted and their parent compounds were prepared by stepwise solid-phase peptide synthesis following standard Fmoc protocols and using previously synthesized or commercial amino acid building blocks

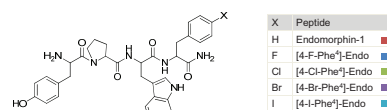


Figure 2. Family of halogenated Endomorphins synthesized (Endo)

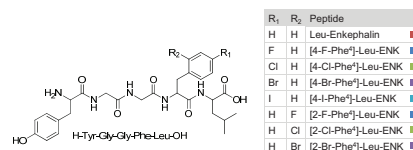


Figure 3. Family of halogenated Leu-Enkephalins synthesized (LeuENK)

BIOLOGICAL ACTIVITY

The binding affinity of peptides for the μ , δ_1 and δ_2 zebrafish cloned opioid receptors in human stably transfected HEK-293 cells have been assessed by measuring [³H]-diprenorphin displacement. Smaller K_i values mean better affinities while bigger ones mean worse affinities.

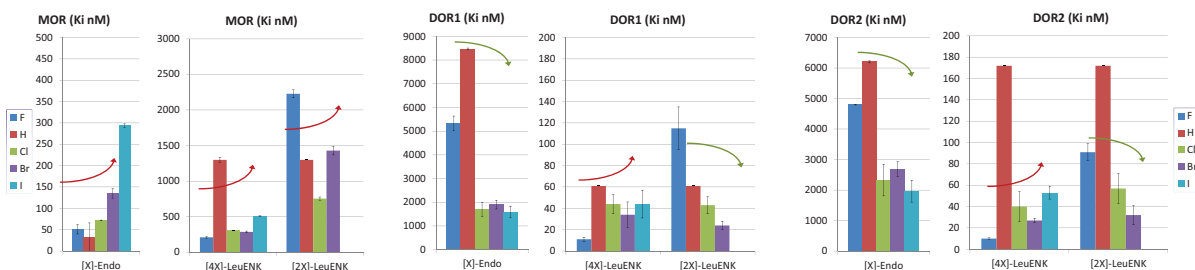


Figure 4. Activity results of the *in vitro* assays. Arrows indicate trend of K_i changes: in green affinity improvement, in red affinity decay.

Non-halogenated Leu-ENK values are extracted from literature, MOR and DOR2 values correspond to the same assay of experimental data,⁶ while DOR1 value correspond to an assay on zebrafish brain homogenates.⁷

REFERENCES

- Ibrahim, M. A. A., Molecular mechanical study of halogen bonding in drug discovery. *J. Comput. Chem.* **2011**, *32* (12), 2554-2574.
- Parisini, E.; Meltrando, P.; Pilati, T.; Resnati, G.; Terraneo, G., Halogen bonding in halocarbon-protein complexes: a structural survey. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40* (5), 2267-2278.
- Auffinger, P.; Hays, F. A.; Westhof, E.; Ho, P. S., Halogen bonds in biological molecules. *PNAS* **2004**, *101* (48), 16789-16794.
- Wilcken, R.; Zimmermann, M. O.; Lange, A.; Joerges, A. C.; Boeckler, F. M., Principles and applications of halogen bonding in medicinal chemistry and chemical biology. *J. Med. Chem.* **2013**, *56* (4), 1363-1385.
- Voth, A. R.; Khuu, P.; Oishi, K.; Ho, P. S., Halogen bonds as orthogonal molecular interactions to hydrogen bonds. *Nat Chem* **2009**, *1* (1), 74-79.
- González-Núñez, V.; Jiménez González, A.; Barreto-Valer, K.; Rodríguez, R. E., *In vivo* regulation of the μ opioid receptor: Role of the endogenous opioid agents. *Mol. Med.* **2013**, *19*, 7-17.
- González-Núñez, V.; Barreto, A.; Traynor, J. R.; Rodríguez, R. E., Characterization of opioid-binding sites in zebrafish brain. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2006**, *316* (2), 900-904.

CONCLUSIONS

- ✓ 4-Phe⁴ halogenated Endomorphin and 2-Phe⁴ halogenated Leu-Enkephalin establish halogen bonding with δ receptors, so in such positions there is enough free space for the halogen and it makes a new favorable interaction.
- ✓ The other assayed series do not establish halogen bonding due to steric hindrance or a lack of interaction directed to the halogen.
- ✓ Further computational studies are in process in order to bring more knowledge to the binding between those neuropeptides and the active center.

EXPERIMENTAL AND COMPUTATIONAL EXAMINATION OF LIGAND TO OPIOID RECEPTOR AFFINITY MODULATION USING HALOGEN BONDING

M. Rosa¹, V. González-Núñez², G. Caltabiano³, K. Barreto-Valer², R. E. Rodríguez², L. Pardo³, G. Arseguell¹, G. Valencia¹

¹Institute of Advanced Chemistry of Catalonia - Spanish National Research Council (IQAC-CSIC), Barcelona (Spain)

²Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Medicine, Institute of Neuroscience of Castilla y León (INCYL), University of Salamanca (Spain)

³Laboratory of Computational Medicine, Biostatistics Unit, Faculty of Medicine, Autonomous University of Barcelona (UAB) (Spain)

INTRODUCTION

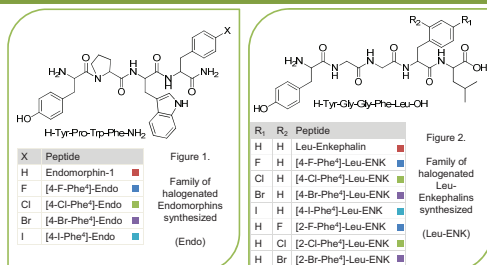
Nowadays, half of molecules entering high throughput screening tests contain halogen atoms.¹ The introduction of these halogens on ligands could improve their activity by generating new molecular recognition sites,² so steric hindrance competes *versus* these new interactions called halogen bonds.^{3,4} These halogen bonds may offer new and versatile tools for the design of ligands as drugs. Two series of halogenated analogs of Leu-Enkephalin (H-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-OH) and Endomorphin-1 (H-Tyr-Pro-Trp-Phe-OH) were synthesized and their *in vitro* activities were evaluated towards μ (MOR), δ_1 (DOR1) and δ_2 (DOR2) zebrafish opioid receptors to determine the presence and effect on affinity of halogen bonding between these ligands and Opioid Receptors. Structural information from recent crystal structures⁵ was used to construct a model of interaction between these neuropeptides and opioid receptors to verify interactions.

HALOGEN BONDING EFFECT

Usually, when introducing a bigger atom on a well fitted ligand, the affinity falls down due to steric hindrance following the succession (F/H/Cl/Br/I). In several cases, introducing bigger halogens, there is an affinity improvement due to new interactions that are made by those halogens. These electrostatic interactions between halogens and an acceptor in a specific angle are called halogen bonds.⁶ Experimentally, if halogen bonding is achieved, affinity improvements could be observed by a decrease of the K_i value.

HALOGENATED NEUROPEPTIDES

The halogenated peptide families depicted and their parent compounds were prepared by stepwise solid-phase peptide synthesis following standard Fmoc protocols and using previously synthesized or commercial amino acid building blocks.



BIOLOGICAL ACTIVITY

The binding affinity of peptides for the μ , δ_1 and δ_2 zebrafish cloned opioid receptors in human stably transfected HEK-293 cells have been assessed by measuring [³H]-diprenorphin displacement. Smaller K_i values mean better affinities while bigger ones mean worse affinities.

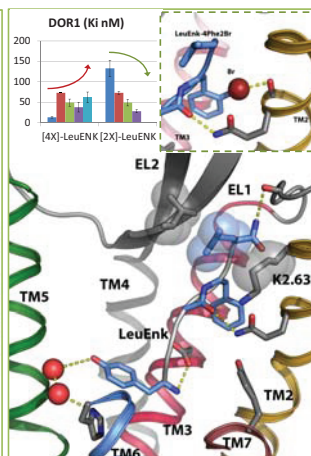
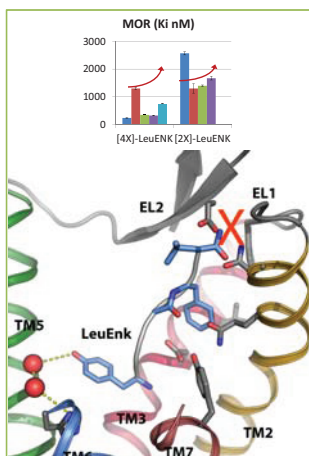
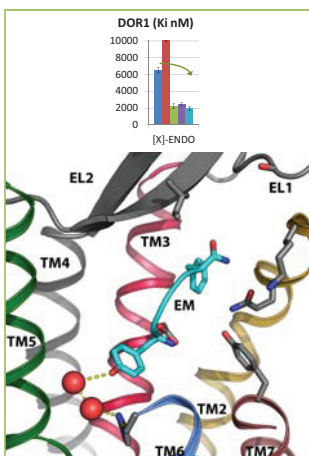
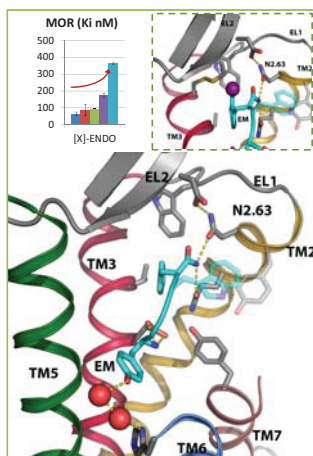


Figure 3. Activity results of the *in vitro* assays and computational representation of interactions between halogenated Endomorphin and μ opioid receptor. Arrows indicate trend of K_i changes. Dotted line indicates halogen bonding interaction.

Figure 4. Activity results of the *in vitro* assays and computational representation of interactions between halogenated Endomorphin and δ_1 opioid receptor. Arrows indicate trend of K_i changes. Dotted line indicates halogen bonding interaction.

Figure 5. Activity results of the *in vitro* assays and computational representation of interactions between halogenated Leu-Enkephalin and μ opioid receptor. Arrows indicate trend of K_i changes. Dotted line indicates halogen bonding interaction.

Figure 6. Activity results of the *in vitro* assays and computational representation of interactions between halogenated Leu-Enkephalin and δ_1 opioid receptor. Arrows indicate trend of K_i changes. Dotted line indicates halogen bonding interaction.

REFERENCES

1. Ibrahim, M. A. A. Molecular mechanical study of halogen bonding in drug discovery. *J. Comput. Chem.* **2011**, *32*, 2564-2574.
2. Parisini, E.; Metrangola, P.; Pilati, T.; Resnati, G.; Terraneo, G. Halogen bonding in halocarbon-protein complexes: a structural survey. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 2267-2278.
3. Aufinger, P.; Hays, F. A.; Westhof, E.; Ho, P. S. Halogen bonds in biological molecules. *PNAS* **2004**, *101*, 16789-16794.
4. Wilcken, R.; Zimmermann, M. O.; Lange, A.; Joergel, A. C.; Boeckler, F. M. Principles and applications of halogen bonding in medicinal chemistry and chemical biology. *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 1363-1385.
5. Manglick, A.; Kruse, A. C.; Kobilka T. S.; Thian, F. S.; Mathiesen J. M.; Sunahara R. K.; Pardo L.; Weis W. J.; Kobilka B. K.; Granier S. Crystal structure of the μ -opioid receptor bound to a morphinan antagonist, *Nature* **2012**, *485*, 321-6.
6. Voth, A. R.; Khuu, P.; Oishi, K.; Ho, P. S. Halogen bonds as orthogonal molecular interactions to hydrogen bonds. *Nat. Chem.* **2009**, *1*, 74-79.

CONCLUSIONS

- ✓ Computational data corroborates information about trends in biological activities.
- ✓ In 4-Phe⁴ halogenated Endomorphin interaction with μ receptor the affinity falls due to steric hindrance.
- ✓ In halogenated Leu-Enkephalins with μ receptor and 4-Phe⁴ halogenated Leu-Enkephalin with δ receptors, a new favorable interaction is not found due to the direction of the halogen.
- ✓ Only 4-Phe⁴ halogenated Endomorphin and 2-Phe⁴ halogenated Leu-Enkephalin establish halogen bonding with δ receptors.